

Phytochelatine
Vorkommen im Pflanzenreich
und
Untersuchungen zur Biosynthese

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Walter Gekeler
aus
Heidenheim/Brenz

März 1988



Muster

Phytochelatine
Vorkommen im Pflanzenreich
und
Untersuchungen zur Biosynthese

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Walter Gekeler
aus
Heidenheim/Brenz

März 1988

1. Referent: Prof. Dr. M. H. Zenk
 2. Referent: Prof. Dr. E.-L. Winnacker
- Tag der mündlichen Prüfung: 6.7.1988



Für Uta
und Anna

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Liste der verwendeten Abkürzungen

ABA	α -Aminobuttersäure
BSO	Buthionin - Sulfoximin
bq	Bequerel (Zerfälle $\times \text{sec}^{-1}$)
CD	Circulardichroismus
Ci	Curie (1 Ci = $2,2 \times 10^{12}$ bq)
cpm	Zählrate (counts per minute)
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DTE	Dithioerythrit (Clelands Reagens)
DTNB	4,4' - Dithiobis - 1,1' - Nitrobenzoesäure (Ellmans Reagens)
FG	Frischgewicht
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
Glu-Aba	γ -Glutamyl α -Aminobuttersäure
Glu-Cys	γ -Glutamylcystein
GS I	Glutamylcysteinsynthetase (EC 6.2.2.2)
GS II	Glutathionsynthetase (EC 6.2.2.3)
GSH	Glutathion
hGSH	Homo - GSH
hPC	Homo - Phytochelatin
HPLC	Hochleistungs - Flüssigchromatographie
M_r	apparentes Molekulargewicht
MT	Metallothionein
Mw	Molekulargewicht
PC	Phytochelatin
SH	Sufhydryl-
SM	Schwermetall
TG	Trockengewicht
TNB ²⁻	Thionitrobenzoat - Anion

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	1
I.1 Schwermetalle in der Umwelt	1
I.2 Biologische Funktionen von Schwermetallen	4
I.3 Schwermetallkomplexierende Liganden	7
I.4 Schwermetalltoleranz in Pflanzen	11
I.5 Schwermetall-bindende Proteine in Pflanzen	14
I.6 Phytochelatine und Glutathion	20
II. Material und Methoden	26
II.1 Biologisches Material	26
II.1.1 Pflanzenzellkulturen	26
II.1.2 Hydrokultur von Pflanzenkeimlingen	26
II.1.3 Kulturbedingungen für Sporophyten	27
II.1.4 Algenkulturen	28
II.1.5 Pilzkulturen	31
II.1.6 Bakterienkulturen	32
II.1.7 Versuchstiere	33
II.2. Chemikalien	33
II.3. Geräte	33
II.4. Analytische Methoden	34
II.4.1 Schwermetallbestimmung	34
II.4.2 Proteinbestimmung	35
II.4.3 Nachweis von SH-Gruppen	35
II.4.4 Derivatisierung von SH-Gruppen	36
II.4.4.1 Derivatisierung mit Monobrombiman	36
II.4.4.2 Reaktion mit N-Ethyl-Maleimid	36
II.4.4.3 Oxidation mit Perameisensäure	36
II.4.5 DC von Aminosäuren und Peptiden	37
II.4.6 Zweidimensionale DC von partialhydrolysiertem DNP-PC ("fingerprint"-Analyse)	37
II.4.6.1 Derivatisierung mit Sanger-Reagens	38
II.4.6.2 Partialhydrolyse von PC-Peptiden	38
II.4.6.3 Zweidimensionale DC von Peptidfragmenten	38

II.4.7	Enzymatisch-chemische Sequenzierung	39
II.4.7.1	Abspaltung des γ -Glutamylrestes	40
II.4.7.2	Modifizierter Edmanabbau	40
II.4.8	Totalhydrolyse und Aminosäureanalyse	41
II.4.9	Bestimmung von GSH	41
II.4.9.1	Dünnschichtchromatographie	41
II.4.9.2	GSH-Bestimmung mit HPLC	42
II.4.9.3	Enzymatische GSH-Bestimmung	42
II.4.10	Bestimmung von PC-Peptiden	43
II.4.11	HPLC-Methoden	43
II.4.11.1	Schnellaufschluß-Methode	43
II.4.11.2	Analytische HPLC	44
II.4.11.3	Semipräparative HPLC	45
II.4.11.4	HPLC-Auftrennung von Monobrombimanderivaten	45
II.4.11.5	HPLC mit Szintillationsdetektion von Radioaktivität im Eluat	46
II.5	Synthese von Substraten	46
II.5.1	Synthese von γ -Glutamyl- ~~α~~ -Aminobuttersäure	46
II.5.1.1	Synthese von N-Phthaloyl-L-Glu-Anhydrid	47
II.5.1.2	Synthese von γ Glu-ABA	47
II.5.1.3	Iontenauschromatographie von Glutamylopeptiden und GSH	48
II.5.2.	Herstellung von γ Glu-Cys aus Glutathion	48
II.5.3.	Isolierung von Homoglutathion	49
II.6	Enzymatische Methoden	50
II.6.1	Enzymaktivitätsbestimmung von GS I und GS II	50
II.6.1.2	Nachweis des freigesetzten Phosphats	51
II.6.2	Isolierung von Enzymen der Glutathionbiosynthese	51
II.6.2.1	Isolierung von Glutathionbiosyntheseenzymen aus Pflanzenzellkulturen	51
II.6.2.2	Anreicherung von GS I und GS II aus <u>E. coli</u>	53
II.6.3	Immobilisierung von Enzymproteinen	54
II.6.3.1	Silanisierung von Glaskugeln	54
II.6.3.2	Kopplung mit Proteinen	54

II.6.4	Enzymatische Synthese unterschiedlich und spezifisch radioaktiv markierter Peptide	55
II.6.5	Reinigung radioaktiv markierter Peptide	56
II.7.	Biologische Methoden	57
II.7.1.	Isolierung von Vesikeln aus Suspensionskulturen von <u>R. serpentina</u>	57
II.7.2.	Organellenisolierung aus Suspensionskulturen	58
II.7.3.	Fixierung von Proben für die Elektronenmikroskopie . . .	61
II.7.4.	Zellkultur-Reihenversuche	62
II.8.	Isolierung von PC-Komplexen aus Pflanzen	63
II.8.1.	Isolierung von PC aus <u>R. serpentina</u>	63
II.8.2.	Modifizierte Methode zur Isolierung von Homo-Phytochelatin-Komplexen	65
II.8.3.	Herstellung metallfreier PC-Peptide	66
II.8.4.	Rekonstitution von PC-Komplexen	66
II.9	Ganzkörperretensionsmessungen	67
III.	Ergebnisse	68
III.1	Phytochelatin-Synthese in Angehörigen der <u>Spermatophyta</u> . .	68
III.1.1	Identität von Phytochelatin-Komplexen aus differen- zierten Pflanzen und Suspensionskulturen	69
III.1.2	Aufbau eines "Screening"-Systems zum Nachweis der Fähigkeit zur Phytochelatinsynthese	71
III.1.4	Verbreitung der Phytochelatin-Synthesefähigkeit in <u>Spermatophyta</u>	75
III.1.5	Verteilung der Phytochelatine in verschiedenen Organen differenzierter Pflanzen	85
III.1.6	Phytochelatine in Nacktsamern	88
III.2:	Phytochelatin und Homo-Phytochelatin in <u>Fabales</u>	91
III.2.1	Verbreitung der Homophytochelatin-Synthese in der Ordnung <u>Fabales</u>	94
III.2.2	Unterschiede im Phytochelatingehalt von Wurzeln und Blättern	101
III.2.3	Äquivalenz von PC und Homo-Phytochelatin	103
III.2.4	Mengenisolierung von Homo-Phytochelatin	110

III.3: Phytochelatinsynthese in weiteren Abteilungen des Pflanzenreichs	114
III.3.1 PC-Synthese in Angehörigen der <u>Sporophyta</u>	114
III.3.2 Phytochelatin in Algen	118
III.3.3 Isolierung des Schwermetall-bindenden Materials aus <u>Chlorella fusca</u>	119
III.3.4 Sequenzierung von Phytochelatin aus <u>Chlorella fusca</u>	123
III.3.5 Sulfid in Phytochelatinkomplexen	127
III.3.6 Induktion der Phytochelatin-Synthese in Algen durch verschiedene Schwermetalle	130
III.3.7 Verbreitung der Phytochelatin-Synthesefähigkeit in den <u>Phycophyta</u>	133
III.3.8 Phytochelatinsynthese in Pilzen	136
III.4 Intrazelluläre Lokalisation des PC-Systems	142
III.4.1. Aufnahme von Schwermetallen in Pflanzenzellen	142
III.4.2 Intrazelluläre Verteilung von PC	153
III.5 Stoffwechselphysiologische Untersuchungen mit ^{109}Cd-markiertem Phytochelatin	161
III.5.1 Austausch des in PC komplexierten ^{112}Cd gegen ^{109}Cd	161
III.5.2 Fütterung markierten Phytochelatins an Ratten	162
III.5.3 Versuch der Dekorporation von ^{109}Cd aus Ratten	164
III.6 Glutathion-Biosynthese	168
III.6.1 Enzymaktivitätsbestimmungen	169
III.6.2 Genauigkeit und Nachweisgrenze der Aktivitätsbestimmung	171
III.6.3 Enzympräparation aus <u>E. coli</u>	173
III.6.4 Identität der enzymatisch hergestellten Produkte	180
III.6.5 Optimierung der Reaktionsbedingungen	180
III.6.6 Präparation radioaktiv markierter Peptide	182
III.6.7 Reinheit der enzymatisch synthetisierten Peptide	187
III.6.8 Biosynthese des Homoglutathions	190
III.6.8.1 Reinigung von Glutathionbiosyntheseenzymen aus Pflanzengewebe	192
III.6.8.2 Substratspezifität der Homoglutathionsynthetase	197

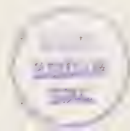
III.7 Fütterung von Peptidsubstraten an Suspensionskulturen . . .	202
III.7.1 Beeinflussung der intrazellulären GSH-Konzentration . .	203
III.7.2 PC-Synthese trotz Hemmung der GSH-Synthese	205
III.7.3 Einbau radioaktiv markierter Peptide in PC	209
III.7.4 Fütterung unmarkierter Peptide	218
IV. Diskussion	230
IV.1 Komplexieren alle Pflanzen Schwermetalle mit dem PC-System?	230
IV.2 Ist das PC-System charakteristisch für das Pflanzenreich, und welche Organismen umfaßt das Pflanzenreich nach diesem Kriterium?	237
IV.3 Kommt neben der PC-Synthese nicht doch auch ein MT-ähnliches Protein in Pflanzen vor?	240
IV.4 Ist PC neben der primären Komplexierung auch für die Schwermetalltoleranz von Pflanzen verantwortlich?	245
IV.5. Ist PC an der Schwermetall-Aufnahme beteiligt, und wo im Cytoplasma wird PC-gebundenes Schwermetall deponiert? . . .	249
IV.6 Ist die Bindung von Cadmium in PC in pflanzlicher Nahrung für dessen Aufnahme relevant?	251
IV.7 Wie wird PC synthetisiert?	254
IV.8 Was determiniert die Synthese von GSH oder hGSH?	260
IV.9 Was begrenzt die PC-Synthesefähigkeit: vielleicht die Glutathionbiosynthese?	263
V. Zusammenfassung	265
VI. Literaturverzeichnis	268

I. Einleitung

I.1 Schwermetalle in der Umwelt

Die Dosis macht den Unterschied zwischen Gift und Heilmittel - das gilt auch für Schwermetalle, die einerseits wegen ihrer Funktion als prosthetische Gruppen von Enzymen essentiell und andererseits wegen der Reaktion mit Liganden in Biomolekülen giftig sind. Die beiden Wirkungen sind wegen der gleichen zugrundeliegenden Prinzipien der Ionen- bzw. Komplexbindung untrennbar verbunden. Schwermetalle sind im Boden vorhanden und werden durch Erosion, aber auch durch Vulkaneruptionen und durch den Stoffwechsel von Mikroorganismen sowie durch von Pflanzen abgegebene Faktoren in wechselnden Mengen verfügbar gemacht (Cataldo und Wildung 1978). Pflanzen müssen sich gegen einen oft steilen Gradienten mit Schwermetallen versorgen oder gegen ein Überangebot und Vergiftung schützen, ohne kurzfristig den Standort wechseln zu können. Der für alle Organismen wesentliche Umweltfaktor Schwermetalle war also in der Evolution wirksam, und eine genetische Basis für einen Toleranzmechanismus wurde z. B. in der Gacklerolone, Morilus guttatus untersucht (Macnair 1983). In der Neuzeit wird verstärkt der Einfluß des Menschen wirksam. Die Industrialisierung - eine große Leistung der Menschheit - birgt u.A. aber Gefahren in sich, weil erhebliche Mengen Schwermetalle verfügbar gemacht werden und als Aerosole oder Staubpartikel in die Atmosphäre, gelöst in das Wasser, oder als Abraum, Klärschlamm oder Schlacke auf die Oberfläche der Lithosphäre gebracht werden.

Neue Mangelerscheinungen (z. B. Zinkmangelsyndrom, hauptsächlich in den USA) und Vergiftungserscheinungen (z.B. Itai-Itai Krankheit in Japan) sind so kurzfristig aufgetreten, daß für die Evolution neuer Schutzmechanismen keine Zeit bleibt. Der Mensch als Verursacher der Belastung und als Endglied der Nahrungskette muß sich für den Mechanismus der Aufnahme und Entgiftung der Schwermetalle dringend interessieren. Da die Aufnahme und Akkumulation von Schwer-



metallen, besonders in marinen Algen und einigen Pflanzen, neben anderen Faktoren auch stark von der Synthese von Liganden zur Komplexierung dieser Metalle abhängig ist, stehen diese Moleküle im Mittelpunkt des Interesses.

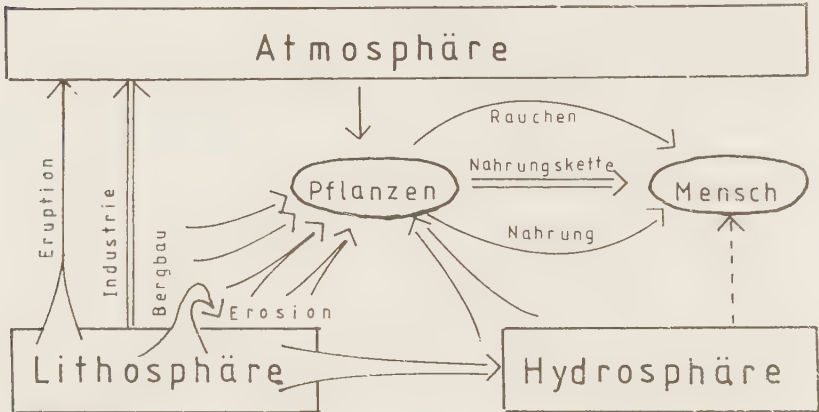


Abbildung 1

Transfer von Schwermetallen in der Natur. Zentrale Rolle der Pflanzen beim Transport der - auch vom Menschen freigesetzten - Schwermetalle über die Nahrungskette zum Menschen. (Nach einer Vorlage aus Umweltbundesamt 1980)

Für die Aufnahme der Schwermetalle in die Biosphäre spielen die Pflanzen eine zentrale Rolle, die in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist. Natürlicherweise in Erd- und Meeresboden vorhandene Schwermetalle werden vom Wasser gelöst und in Pflanzen, dann auch Tieren aufgenommen und zum Teil akkumuliert. An der Auflösung und Verfügbarmachung sind neben anorganisch-chemischen Vorgängen auch Mikroorganismen und von Pflanzen abgegebene Stoffe maßgeblich beteiligt (Cataldo und Wildung 1978, Schlee 1986). Der Mensch hat durch die Industrialisierung den Eintrag von Schwermetallen in Luft, Wasser und Boden stark vergrößert. Aus dem Lebensraum für alle Organismen kommen diese gefährlichen Substan-

zen durch die Nahrungskette auf den Verursacher zurück. Mit Phosphatdünger werden im Durchschnitt dem Boden 3 g Cadmium pro Hektar und Jahr zugeführt, bei intensiver Düngung bis zu 6 g. Der Eintrag über die Luft beträgt bis zu 20 g Cadmium pro Hektar und Jahr, bei Düngung mit Klärschlamm wird noch einmal eine ähnliche Menge zugeführt (die Klärschlammverordnung läßt dies zu!). Der AWI-Wert ("average weighted intake") von 0,4 - 0,5 mg/d für die Aufnahme von Cadmium der FAO/WHO wird bereits heute oft erreicht (Kruse und Lommel 1979).

In reduzierenden, schwefelhaltigen, alkalischen Böden sind die Schwermetalle grundsätzlich zum Beispiel als Sulfide schwerer verfügbar (aber durch Oxidation freisetzbar) als in sauren, Carbonat-, Phosphat-, Sulfat-, und Silicat-haltigen Böden (Fischer 1987). Aus diesen und aus der z. T. komplexen Bindung an Humin- und Fulvinsäuren können die Schwermetalle durch äußere Einwirkung (saurer pH des Regenwassers, Abbau der Huminstoffe durch Bodenbakterien) oder durch von den Pflanzen ausgeschiedene Chelatoren (z. B. Zitronensäure, Essigsäure) aufgelöst und verfügbar gemacht werden (Schlee 1986). So ist zum Beispiel bei Säureeinwirkung auf Kalkböden die Erhöhung der Calciumkonzentration mit einer Freisetzung von Schwermetall-Ionen aus Huminstoffen verbunden. Allgemein sind Cadmium und Zink wesentlich leichter mobilisierbar und schon bei höheren pH-Werten verfügbar als zum Beispiel Blei und Kupfer.

In Algen wurden erhebliche Anreicherungen, mehrere Größenordnungen gegenüber dem umgebenden Medium, von verschiedenen Schwermetallen (Pb, Cd, Hg, As) gefunden. Diese Anreicherung stellt eine mögliche Gefahr für den Konsumenten vermeintlich besonders gesunder Produkte ("seaweed-steaks" und "single cell protein") dar und ist nur durch Wachstum von Algen in schwermetallfreien Medien zu vermeiden (Becker 1986). In der Regel werden vor allem Cd^{2+} und Ni^{2+} relativ leicht von Pflanzen aufgenommen und in die Sprosse verlagert (de Haan, 1975).

In Sojabohnen wird mehr als 70% des aufgenommenen Cd^{2+} bei Samenreifung in den (als Nahrung dienenden) Kotyledonen festgelegt (Cataldo et al. 1978). Bezüglich der Schwermetall-Aufnahme zeigen sich jedoch ausgeprägte Unterschiede zwischen verschiedenen Kulturpflanzenarten. So ist z. B. bei Weizen, Salat, Kohl oder Spinat die Nickel-Aufnahme hoch gegenüber z. B. Hafer (Hunter und Vergnano, 1953). Bei den Ökotypen der Wildflora wurden ähnliche Unterschiede festgestellt (Ernst 1974, Schlee 1986).

Für Cadmium, das als Ursache der Itai-Itai ("Aua-aua") Krankheit erkannt wurde (Tsuchiya 1978) und das durch chronische, unterschwellige Vergiftungserscheinungen in industrialisierten Ländern eine Gefahr für die Gesundheit darstellt (Friberg et al. 1974) dient z.B. im Menschen Metallothionein (MT) als Entgiftungsmechanismus. MT-Synthese wird bei Überschreiten einer Grenze von 30 ppm Cadmium induziert (Bremner et al. 1973). Eine Schädigung der Niere tritt bei Konzentrationen von über 200 ppm ($\mu\text{g/gFG}$) im Nierengewebe aller untersuchten Säugetiere auf (Webb und Cain 1982). Solche Schäden können durchaus als Zivilisationsschäden bezeichnet werden: Tabak akkumuliert Cadmium, das Rauchen von 20 Zigaretten führt dem Körper 1,5 μg Cd zu (Hallenbeck 1984).

I.2 Biologische Funktionen von Schwermetallen

Die Elemente können eingeteilt werden in solche, die essentiell, aber in höheren Konzentrationen toxisch sind (Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cr), solche die essentiell, aber auch bei höherer Konzentration unkritisch sind (Fe, Mg, Ca) und solche die nicht essentiell, aber toxisch, häufig jedoch in geringen Konzentrationen tolerierbar sind (z.B. Cd, Pb, Hg, Au, Ag, Pt). Abbildung 2 zeigt schematisch die Beeinflussung des relativen Wachstums als Maß für die Toxizität in Abhängigkeit von verschiedenen Mengen von Schwermetallen.

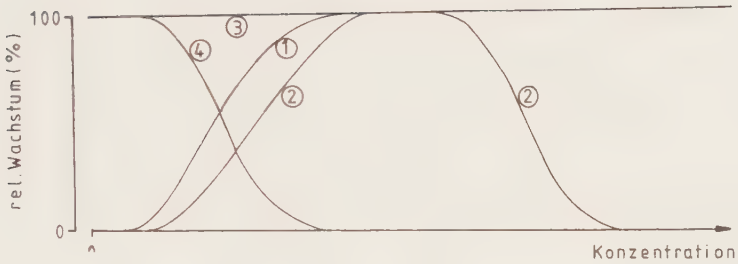


Abbildung 2

Beeinflussung des relativen Wachstums von Pflanzen durch 1: essentielle, 2: essentielle, aber in höheren Konzentrationen toxische, 3: unkritische und 4: toxische Schwermetalle. Konzentrationsskala logarithmisch. (Nach Schlee 1986, verändert).

Metall-Liganden-Interaktionen spielen eine Schlüsselrolle bei der Wirkung von Schwermetallen in biologischen Systemen. Elektronenübertragende, Redoxreaktionen eingehende Metallionen werden durch Liganden in ihrer Position gehalten, Liganden werden orientiert, polarisiert, aktiviert oder die Bindung von Substratmolekülen an Enzyme durch diese erleichtert. Die giftige Wirkung von gewissen Chelatoren (Cyanid, H_2S , EDTA) beruht auf der Entfernung von essentiellen Schwermetall-Ionen oder der Blockierung von Metallen als prosthetische Gruppen. Giftige Metalle (Co, Hg) wirken über Schwermetall-Austausch an Liganden von Proteinen, dabei wird die Konformation und die Reaktivität verändert. Arsenat z. B. wirkt über die Ähnlichkeit mit Phosphat bei sehr geringer Stabilität der Ester entkoppelnd auf die Atmungskette.

Carboanhydrase, manche Dehydrogenasen, tierische (nicht pflanzliche!) Carboxypeptidase und alkalische Phosphatase benötigen Zn^{2+} zu ihrer Aktivität, das als Lewis-Säure wirken und eine Carbonylbindung polarisieren, aber auch als konjugierte Base Reaktionen erleichtern kann (Williams 1984).

Das Magnesium im Chlorophyll, dem mengenmäßig bedeutendsten Biomolekül, ist für das Leben auf der Erde (Nahrung, Energie) von grundlegender Bedeutung. Bei der Wasserspaltung im Photosystem II, bei den Reaktionen an Pyruvatcarboxylase, Lactosesynthetase, mitochondrialer Superoxiddismutase und im Cocanavalin A sind Mn-Ionen beteiligt. Nickel findet sich in Urease, dem ersten kristallisierten (Sumner 1926) Enzym. Molybdän ist in Form des Molybdäncofaktors in den Enzymkomplexen Nitrogenase und Nitratreduktase essentiell. Kovalent an C-Atome gebunden sind Kobalt im Cobalamin und Chrom im Glucosetoleranzfaktor (Metzler 1977).

Eine besondere Gruppe von Proteinen sind die Cu-Proteine, die in drei Klassen eingeteilt werden können. Cu-Proteine vom Typ I zeigen die tiefblaue Farbe des Cu^{2+} -Komplexes und ein ungewöhnliches ESR-Spektrum mit hyperfeiner Aufspaltung. Zwei Histidine, ein Cystein und ein Methioninrest komplexieren das Cu, das hauptsächlich in Elektronentransferproteinen vorkommt. Beispiele sind Cytochrom C-Oxidase, Azurine, Tyrosinase, Stellacyanin und Plastocyanin. Typ II Cu-Proteine (diese Proteine weisen ein normales ESR-Spektrum auf) sind z. B. die Cu-Zn-Superoxiddismutasen. Typ III Cu-Proteine schließlich enthalten ein Cu ohne ESR-Signal. Beispiele sind Hämocyanin, Laccase und Ascorbatoxidase. Die letzten beiden sind pflanzliche Enzyme.

Die Funktion des Eisens in Hämoglobin, Leghämoglobin und Katalase in der Übertragung von Sauerstoff, und bei der Übertragung von Elektronen in Cytochromen ist eminent wichtig. Das Eisen nimmt insofern eine Sonderstellung ein, als es aus der 3-wertigen Stufe durch Hydrolyse rasch in die unverfügbare Hydroxidform überführt wird. Deshalb sind spezielle Mechanismen zur Aufnahme entwickelt worden: Transferrin und Ferritin in Tieren (letzteres neben MT das Schwermetall-reichste Protein), in Mikroorganismen niedermolekulare Eisenchelatoren, die Siderophore, zum Beispiel vom Hydroxamat- oder Katecholtyp und in höheren Pflanzen die Phytosiderophore.

I.3 Schwermetallkomplexierende Liganden

Im Tierreich wurde Metallothionein (MT) als der wesentliche Ligand für Zink, Cadmium und Kupfer erkannt. Zuerst aus Pferden isoliert (Margoshes und Vallee 1957), wurde dem Protein bald die Aufgabe der Homöostase und Detoxifikation von Schwermetallen zugeschrieben (Kägi und Vallee 1961).

MT hat folgende charakteristische Eigenschaften (Kägi und Kojima 1986):

- Mw zwischen 6000 und 7000 Dalton ($M_r = 10\text{kDa}$, Gelfiltration).
- Hoher Metallgehalt (7 mol/mol Protein)
- Besondere Aminosäurezusammensetzung (ca. 30 mol% Cystein, keine aromatischen Aminosäuren, kein Histidin)
- Metall-Thiolat-Absorption bei 254 nm, säurelabil
- Auftreten von Cys-x-Cys "Clustern" in regelmäßiger Anordnung.

Die Stöchiometrie von 7 mol/mol Protein für zweiwertige Kationen oder ca. 3 Cys/Schwermetall gilt nicht streng für Cu^{1+} , Ag^{1+} und Hg^{2+} , die auch andere Koordinationen als tetraedrische auch mit anderen Liganden eingehen und deshalb in höherer Menge gebunden werden. Die Bindungskonstanten für Cd^{2+} ($10^{22}/\text{M}$, für pH = 7: $10^{16}/\text{M}$) und für Zn^{2+} ($10^{18}/\text{M}$, pH = 7: $2 \times 10^{12}/\text{M}$) wurden von Vasak und Kägi (1983) bestimmt. Die Schwermetalle werden in MT in tetraedrischer Koordination von vier Cysteinresten komplexiert. Säurelabiler Schwefel wie in Fe-S-Proteinen wurde nicht gefunden. Spektroskopische, hauptsächlich ^{113}Cd NMR-Daten zeigten eine Komplexbildung von 3 bzw. 4 Cadmiumionen in "Clustern", die mit A bzw. B bezeichnet wurden (Otvos und Armitage, 1980). Daraus wurde eine räumliche Struktur der Cd-Bindung in zwei Domänen vorgeschlagen (Winge und Miklossy, 1982). Kürzlich wurde die räumliche Anordnung der Aminosäuren und Schwermetalle in Ratten-MT durch Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 2,3 Å bestimmt (Furey et al., 1986).

Die bisher bekannten Sequenzen von MT (aus Pferd (Kojima et al., 1976), Mensch (Kissling und Kägi 1977), Kaninchen

(Kimura et al., 1979), Ratte (Kissling et al., 1979), Hamster (Griffith et al., 1983) und Affe (Schmidt und Hamer 1983) sind sehr ähnlich. Vor allem die Aminosäuresequenz am Amino- und Carboxyterminus, sowie ein zentraler Bereich und die Anordnung der Cys-x-Cys Cluster sind besonders stark konserviert. Präparationen von MT können durch Ionentausch- und Gelchromatographie sowie HPLC in mehrere Isoformen aufgespalten werden, die als MT I und MT II bezeichnet werden. Es wurden bis zu elf Gene und/oder Pseudogene für MT in Säugetier-Organismen festgestellt (Karin und Richards 1982). Anhand dieser Isoformen und ihrer Sequenzen wurde eine Evolutionsrate von $5 - 7 \times 10^{-10}$ Aminosäureaustauschen pro Codon und Jahr errechnet (Hunziker und Kägi, 1984). Die langsame Evolution / starke Konservierung und das ubiquitäre Auftreten zumindest im Tierreich belegen die zentrale Rolle des MT für den Stoffwechsel.

MT aus Pilzen zeigen weniger Homologie zu Säugetier-MT (ca. 40 %) oder sind nur 25 oder 26 Aminosäuren lang (Lerch 1980, Beltramini und Lerch 1983). Auch das MT aus Drosophila (Lastowsky-Perry et al. 1985) ist mit 40 Aminosäuren wesentlich kürzer als Säugetier-MT; die vorhandenen Homologien jedoch weisen auch diese Proteine als MTs aus (Lerch 1980). MTs enthalten neben Cd^{2+} nur Zn^{2+} und in manchen Präparationen auch Cu^{+} und Hg^{+} (Kägi und Vallee, 1961). Künstlich kann die Synthese des MT durch Gabe giftiger Schwermetall-Kationen, zum Beispiel Cd^{2+} , Pb^{2+} oder Cu^{2+} (Squibb und Cousins 1977, Enger et al. 1979, Karin und Herschman 1981) sowie durch Glucocorticoide (Fiella und Cousins, 1978, Hager und Palmiter 1981, Karin und Herschman, 1981, Karin et al., 1984) oder α -Interferon (Friedman und Stark 1985) ausgelöst werden.

MT wurde schon früh eine Funktion in Schwermetall- Detoxifikation und -Homöostase zugeschrieben (Kägi und Vallee 1961). Der Zusammenhang zwischen Cadmiumvergiftung, MT-Synthese und Itai-Itai-Krankheit (Tsuchiya 1979) wurde bereits erwähnt. Cousins (1979) schlug ein Modell vor, wonach die Konzentra-

tion von MT in der Mucosa die Aufnahme von Zink aus dem Darm, und die Konzentration von MT in der Leber die Aufnahme von Zink aus dem Blut bestimmen. Intravenös appliziertes Cd-MT kann von der Niere aufgenommen werden und diese schädigen (Nordberg et al., 1975). Eine Funktion von MT in der Schwermetall-Homöostase belegt der Befund, daß MT aus Neurospora crassa gebundenes Cu an Apoproteine (z.B. Tyrosinase aus Neurospora und Haemocyanin aus Carcinus) abgeben kann (Beltramini und Lerch 1983). Einen Hinweis auf die Funktion von MT in der Schwermetall-Homöostase gibt der Befund, daß MT auch physiologischerweise in parenchymatischen Geweben, vor allen Dingen der Leber von Säugetieren vorkommt (Webb und Cain 1982). Hohe Gehalte sind in Föten und Neugeborenen zu beobachten, zu einer Entwicklungszeit, die mit starker Synthese von zum Beispiel schwermetallhaltigen Enzymen verbunden ist (Baker 1987).

In Säugetierorganismen und Bäckerhefe ist - im Gegensatz zu Pflanzen - die genetische Basis des Schwermetall-resistenzmechanismus geklärt. Cadmiumresistenz in Mäusen und Ratten ist sowohl durch Aktivierung der Transskription als auch durch Vervielfältigung der Gene verursacht (Beach und Palmer, 1981). Fogel und Welch (1982) konnten zeigen, daß die Kupferresistenz in Hefe durch Tandemvervielfältigung (10 - 15 fach) eines 1,95-kb DNA-Fragments verursacht ist. Butt et al. (1984) konnten zeigen, daß Transformation eines Cu-sensitiven Hefestammes mit einem Klon, der ein in Cu-resistenten Stämmen vervielfachtes Gen enthielt, zur Cu-Resistenz im vorher sensitiven Stamm führte. Die Sequenz des Gens wurde ermittelt, das Genprodukt ist ein Metallothionein (Butt et al. 1984).

Außer in Hefe wurden MT-Proteine auch in anderen Pilzen nachgewiesen. Das Cu-MT aus dem Ascomyceten Neurospora crassa mit 25 Aminosäuren (Lerch 1980) wurde bereits erwähnt. Kruse und Lommel (1979) untersuchten Cd-bindende Proteine in Agaricus arvensis und fanden zwei Proteine von 2000 bzw. 15000 - 20000 Da. Münger und Lerch (1985) charak-

terisierten das Cu-MT aus Agaricus bisporus. Dieses Protein besteht ebenfalls aus nur 25 Aminosäuren, hat einen hohen Cysteingehalt (28 %) und bindet 6 mol Cu^+ . Die Sequenzhomologien mit dem aminoterminalen Teil von Neurospora crassa-Cu-Mt (76,9%) und human-MT (38,4 %) weisen das Protein trotz der geringen Größe als MT aus. Lerch (1981) berichtet, daß die MTs aus Pilzen ausschließlich Kupfer enthalten, im Gegensatz zu Säuger-MTs, die außerdem noch Cd^{2+} , Zn^{2+} und Hg^{2+} binden.

MT ist in Pilzen nicht generell für Schwermetall-Bindung verantwortlich: im Fliegenpilz hat man Vanadium in Amavadin gebunden gefunden, ein Komplex, der aus 2 Molekülen Hydroxy-Iminodipropionsäure und einem Ion Vanadium besteht und ein Molekulargewicht von 415 Dalton aufweist (Bayer und Kneifel 1973). In Agaricus macrosporus wurde ein cadmiumbindendes Phosphoglycoprotein, genannt Cadmium-Myco-Phosphatin, gefunden, das keine schwefelhaltigen Aminosäuren enthält. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 12000 Da und einen isoelektrischen Punkt unter $\text{pH} = 2$ (Schmitt und Meisch 1985). Yamaguchi et al. (1978) fanden ein MT-ähnliches Protein in Tetrahymena pyriformis. Suzuki et al. (1986) entwickelten einen Enzym-Immunoassay für dieses Protein und fanden, daß die Antikörper nicht mit MT aus Säugern kreuzreagieren.

Ein bakterielles Cd-bindendes Protein vom $M_r = 39000$ Da fanden Khazaelis und Mitra (1981) in E. coli; Higham et al. (1983, 1984, 1986) untersuchten ebenfalls von MT deutlich unterschiedene (M_r , UV-Spektrum, Aminosäurezusammensetzung) Cd-bindende Proteine in verschiedenen gramnegativen Bakterien. Im grampositiven Staphylococcus aureus wurde die genetisch fixierte Cd-Toleranz auf einen verminderten Cd-Transport und eine energieabhängige Ausschleusung des Cd durch eine Plasmid-codierte Resistenz erklärt (Tynecka et al., 1981). Olafson et al. (1979) fanden ein "Cyanobakterielles Metallothionein" in Synechococcus, einer blaugrünen Alge, mit einem M_r von 8100 Da und einem pI von 4,3.

Auch in eukaryontischen Algen, den einfachsten grünen Pflanzen, deren Mechanismus zur Schwermetall-Komplexierung von großem Interesse ist, wurden schwermetallbindende Proteine untersucht. Stokes et al. (1977) fanden in einem Cu-toleranten Stamm von Scenedesmus acutiformis 40 % (vgl. mit 80 % im nicht-toleranten Stamm) des Cu in der löslichen Fraktion mit einem Protein von 10000 Da assoziiert. Das Protein war durch Cu^{2+} induzierbar und eluierte bei Chromatographie auf Sephadex G-75 deutlich von freiem Cu^{2+} und Proteinen getrennt.

Hart und Bertram (1980) fanden ein cadmiumbindendes Protein in Chlorella pyrenoidosa. Das Molekül von 12,8 kDa wurde durch Gelchromatographie bei pH = 7,5 in eine 6500 Da große Substanz überführt. Die Induktion wurde durch Einbau von ^{35}S und ^{115}Cd verfolgt, es wurde keine Induktion durch Zn^{2+} festgestellt.

Nagano et al. (1982) berichten ebenfalls, daß Zn nicht induzierend auf das (ähnlich wie das von Stokes et al. (1977) gefundene Protein chromatographierende) cadmiumbindende Protein aus Chlorella ellipsoidea wirkt. Nagano et al. (1984) beschrieben dieses Protein aus Chlorella ellipsoidea genauer. Das Molekulargewicht ist 9000 Da, der pI liegt bei pH=4,0, und von 69 Aminosäuren wird die Hauptmenge von Glu, Cys, Arg und Gly gebildet.

I.4 Schwermetalltoleranz in Pflanzen

Schwermetalltoleranz in höheren Pflanzen zieht ebenfalls seit Jahrzehnten das Interesse der Forscher auf sich. Die Mechanismen der Adaptation und die molekulare Basis für die Schwermetalltoleranz wurden in Laufe der letzten 25 Jahre intensiv untersucht (Ernst 1974). Pflanzengemeinschaften, die auf natürlicherweise schwermetallreichen Böden, zum Beispiel Serpentinböden, oder auf Abraumhalden von Minen vorkommen, sind unter der Bezeichnung Galmeipflanzen zusammengefaßt worden (Baumeister 1967). Obwohl die meisten dieser Pflanzen zu den Familien Poaceae, Caryophyllaceae und

Lamiaceae gehören, sind auch schwermetalltolerante Pflanzen aus anderen Familien, zum Beispiel Fabaceae bekannt (Ernst 1974). Neben wenigen sogenannten Metallophyten, die nur auf Schwermetallstandorten vorkommen, sind die meisten Schwermetall-toleranten Pflanzen nur Varietäten auch anderswo vorkommender Arten (Ernst 1974, Baumeister und Ernst 1978). Auf Serpentinstandorten finden sich z. B. solche Ökotypen von Asplenium viride, Sempervivum hirsutum und Stachys recta (Braun-Blanquet, 1964). Für die Adaptation wesentlich scheint die genetische Variabilität der Art zu sein. Aus nicht-toleranten Populationen einiger Arten der Poaceae ließen sich aus großen Proben von Samen einzelne tolerante Pflanzen erhalten. Pflanzen, die auf Schwermetallböden nicht vorkommen, wiesen diese Variabilität nicht auf (Bradshaw, 1984).

Einige Pflanzen, im gemäßigten Klimaraum häufig Angehörige der Brassicaceae, reichern spezifisch zur ein bestimmtes Metall an, kommen z.T. endemisch nur auf Schwermetallböden vor und werden als Indikatorpflanzen oder Schwermetallzeiger bezeichnet. Beispiele sind Minuartia verna Subspezies herzynia, die Kupferblume für Kupfer, Thlaspie- und Alyssumarten für Nickel und - aus der Ordnung Violaceae - Viola calaminaria, das Galmeiveilchen, für Zink. Auf Serpentinstandorten des tropischen und subtropischen Raumes sind es vor allem Arten der Violaceae und Flacourtiaceae. Hybanthus zum Beispiel akkumuliert bis zu 1,5 % des TG an Nickel, der Baum Sebertia acuminata kann bis zu 25,7 % des TG an Nickel in seinem Saft akkumulieren (Jaffrè et al. 1976). Solche Pflanzen, die Schwermetalle über 1000 µg/g Trockenmasse anreichern, werden als Hyperakkumulatoren bezeichnet (Brooks et al. 1977). Beispiele sind Arten von Alyssum, die Ni bis zu 10000 µg/g anreichern (normalerweise 1 µg/g auf normalen, 50 µg/g auf Serpentinstandorten). Neben dem oben erwähnten Hybanthus floribundus sind Aeolanthus rosulifolius (akkumuliert bis zu 13700 µg Cu/g Trockengewicht) und Haumaniastrum

robertii (akkumuliert bis zu 10200 µg Co/g Trockengewicht) (Brooks et al. 1980) erwähnenswert.

Für die Resistenz oder Toleranz gegen Schwermetalle kann einer oder mehrere der folgenden Mechanismen in Frage kommen:

1. Ausschluß, in welchem Fall Aufnahme und Transport der Schwermetalle unterbunden wären,
2. Aufnahme und Entgiftung der Metalle, wobei Bindung in Cytosol an entgiftende Komplexe, Bindung an Zellwand-Bausteine und Ablagerung in der Vakuole in Frage kommen, und
3. Adaptation von Enzymen und Stoffwechselwegen an die vorhandenen, giftigen Konzentrationen von Schwermetallen.

Während der Ausschluß (z. B. bei Festuca ovina, Baumeister und Ernst (1978)) oder die verhinderte Aufnahme hauptsächlich in Zusammenhang mit Mycorrhiza-Symbiosen festgestellt wurden (Bradley et al. 1982, Brown und Wilkins 1985), sind die meisten der untersuchten Mechanismen letztlich auf Internalisierung und Komplexierung der Schwermetalle gerichtet (Baker 1987).

Eine Abhängigkeit der Schwermetallaufnahme von der Kationenaustauschkapazität der Zellwände der Wurzelzellen wurde bei Ökotypen von Silene cucubalus festgestellt (Ernst 1974). Die Fixierung und Anreicherung von Schwermetallen in der Zellwand wird unter Anderem durch spezifische Proteine mit SH-Gruppen erreicht (Poulter et al. 1985, Turner und Marshall, 1972). Ebenfalls in Silene cucubalus wurde festgestellt (Mathys, 1977), daß Zink in den Vakuolen an Malat und Oxalat cheliert gespeichert wird. Gleiches gilt für die Akkumulation von Ni bei Hybanthus-arten (Kelly et al., 1975).

Für die Ausscheidung von Schwermetallen aus der Pflanze kommt neben dem Blattfall im Herbst vor allem die Ausscheidung über Salzdrüsen: durch Guttation (Ernst, 1974) in Frage. Die erhöhte Aktivität des sogenannten Zink-Malat-Wegs in toleranten Pflanzen mit höherem Gehalt an organischen Säuren, besonders Malat, wurde auch als Ursache für den

erhöhten Bedarf dieser Pflanzen (zum Beispiel Arten von Silene) an Zink erkannt. Das Schwermetall wird nach der Aufnahme durch das Plasmalemma im Cytoplasma komplexiert. Als Zink-Malat-Komplex wird es in die Vakuole transportiert, wo stabilere Komplexe, zum Beispiel mit Oxalat und Citrat gebildet werden können, die das Metall aus dem Cytoplasma entziehen (Mathys 1975). Auch für Nickel in den oben beschriebenen Hyperakkumulatoren wird ein ähnlicher Komplexierungsweg diskutiert (Kelly et al., 1975; Jaffrè et al. 1976). Im Gegensatz dazu ist für Schwermetall-tolerante Pflanzen, die auch auf Schwermetall-armen oder -freien Böden gedeihen können, ein flexibler Entgiftungsmechanismus durch induzierbare Synthese eines Linganden anzunehmen.

Dies zeigt, daß bei den Anpassungen an Schwermetall-Standorte offenbar recht unterschiedliche Mechanismen eine Rolle spielen. Das führt auch zu recht unterschiedlichen Schwermetall-Aufnahmen: So betrugen z. B. bei einem Nickelgehalt des Bodens von 700 ppm die Gehalte in den Pflanzenaschen bei Silene cucubalus 0,004 %, bei Alyssum tortuosum 1 % und bei Hybanthus floribundus 23 % (Petrunina, 1974; Severne und Brooks, 1972).

I.5 Schwermetall-bindende Proteine in Pflanzen

Die Beteiligung von MT-ähnlichen Komplexen bei der Toleranz gegen Schwermetalle in Pflanzen wurde durch die grundlegende Bedeutung dieses Proteins im Tierreich nahegelegt, deshalb suchten viele Arbeitsgruppen ein pflanzliches, schwermetall-bindendes Protein nachzuweisen.

Premakumar et al. (1975) waren die Ersten, die außer in Säugetieren und Bäckerhefe auch in einer höheren Pflanze, in Phaseolus aureus (Mungobohne) ein durch Cu^{2+} induziertes, kupferbindendes "Metallothionein" von 8000 Da fanden. Die Absorptionsspektren, ein Gehalt von 15 mol% Cys und die elektrophoretische Mobilität waren unter diesen Proteinen identisch.

Nicholson et al. (1980) fanden dagegen in Cu^{2+} -belasteten Mungobohnen Akkumulation von Kupfer in Plastocyanin. Casterline und Barnett (1977, 1982) beschrieben ein Cd-induzierbares, Cd-bindendes Protein aus Sojapflanzen mit einem M_r von 13,8 kDa.

In Tomaten und Sojabohnen war Nickel in hochanionischen Komplexen festgelegt (Cataldo et al., 1978), die in ihrem M_r unter 10000 Da lagen. Diese Komplexe wurden in der Wurzel gebildet und im Xylemstrom transportiert, um in den Blättern, bei Samenreifung in den Keimblättern festgelegt zu werden. Cataldo et al. (1981) beschrieben außerdem einen Komplex mit einem Molekulargewicht größer als 10000 Da in Sojabohnenwurzeln.

Weigel und Jäger (1980) untersuchten die intrazelluläre Verteilung von Cd in Bohnen. Hauptsächlich in Wurzeln akkumuliert, war das Metall zu mehr als 70 % im Cytoplasma und zu 8 % - 14 % an Zellwand oder Organellen lokalisiert. In der löslichen Fraktion war das Cd an eine Proteinfraction von 5000 - 10000 Da gebunden. In Blättern wurden wesentlich kleinere (700 - 5000 Da) Komponenten festgestellt. Im selben Jahr (1980) berichteten Bartolf et al. über ein in Tomatenpflanzen induzierbares, Cd-bindendes Protein von 10 kDa.

Ein MT-ähnliches Protein aus Reis fanden Kaneta et al. (1983), das 12 μg Cd/mg Protein und die von anderen Arbeiten bekannte sehr feste Bindung an DEAE-Ionentauscher aufwies. Rauser und Curvetto (1980) bezeichneten ein aus Cu-tolerantem Straußgras *Agrostis gigantea* isoliertes Protein als pflanzliches Metallothionein. Das M_r von 14,4 Da, die Absorptionsspektren und die Aminosäureanalyse (hauptsächlich Cys, Gly, Glu, Asp und Ser) wurden so interpretiert. Auch andere Autoren hoben ausdrücklich den Proteincharakter der pflanzlichen Komplexe hervor: Jackson et al. (1984) berichteten, die Synthese schwermetallbindender Proteine in Cd-toleranten *Datura*-Zellkulturen sei von polyA⁺-RNA abhängig.

Rauser et al. (1983) isolierten und charakterisierten ein Cd-bindendes Protein aus Agrostis gigantea. Der Komplex mit einem M_r von 3700 Da, 110 μg Cd/mg Protein (das ist 4 Cd/mol Protein) und einem Cd/Cys -Verhältnis von 1 zu 2,7, sowie die spektroskopischen Daten (Absorption bei 260 nm, charakteristische Maxima und Minima im CD-Spektrum) wurden als Indizien für ein MT-Protein interpretiert.

Wagner und Trotter (1982) untersuchten Rotkohl (Brassica capitata) und Tabak (Nicotiana glauca x langsdorffii). Das Cd war in einem Komplex von M_r 10000 Da gebunden. Der Komplex war in geringen Mengen konstitutiv vorhanden, seine Menge war von der Konzentration an Cd im Medium und der Dauer der Exposition abhängig. Wagner (1984) stellte unter denaturierenden Bedingungen ein M_r von nur 2000 Da fest. Die Aminosäureanalyse ergab 37 mol% Glu, 28 mol% Cys und 9 mol% Gly, die Hitzestabilität, Proteaseunempfindlichkeit, das Versagen des Edman-Abbaus und das Verhalten in der Elektrophorese - der Komplex befand sich zwischen der Pufferdiskontinuität und Bromphenolblau-Front -, sowie in der IEF - pI knapp über 3 - zeigten signifikante Unterschiede zu MT. Rauser (1984) beschrieb, daß die aus Agrostis gigantea isolierten Komplexe unter denaturierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von 2000 bis 4000 Da aufwiesen.

In Cu-tolerantem Spinat fanden Tukendorf et al. (1984), daß das Cu mit niedermolekularen Proteinen von 12500 und 9500 Da assoziiert war. Die Aminosäureanalyse wies hauptsächlich Asp, Glu, Pro, Ala, Val und Leu auf. Die Spezies waren mit Coomassie-Blau anfärbbar. Die subzelluläre Verteilung zeigte über 70 % des Cu im Cytosol, in den Chloroplasten wurde gegenüber sensitiven Pflanzen keine Erhöhung festgestellt.

Lolkema et al. (1984) diskutieren die Rolle MT-ähnlicher Proteine in der Cu-Toleranz von Suspensionskulturen von Silene cucubalus (Taubenkropf). Sie fanden ein in tolerant Pflanzen verstärkt induzierbares Protein von 8500 Da. Das Wachstumsoptimum war von 1 μM auf 20 μM bei dem tolerant

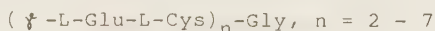
Stamm verschoben. In den toleranten Pflanzen zeigte sich ein neuer, intermediärer "Peak" im Elutionsprofil der Sephadex G-50 Chromatographie. Zink, allein oder im Zusammenhang mit Kupfer gegeben wurde nicht in diesem "Peak", sondern im Bereich der freien Ionen aufgefunden.

Grünhage et al. (1985) isolierten ein Cd-bindendes Protein aus Erbsen, das ein Molekulargewicht von 6000 - 10000 Da sowie ein UV -Spektrum entsprechend dem von MT aufwies. Auch der Cd-Gehalt (8,6µg Cd/mg Protein) stimmte mit dem von Ratten-MT (8,07/8,23 mg Cd/mg MT) überein.

Fujita (1985) isolierte aus Wasserhyazinthen, Eichhornia crassipes, zwei Cd-bindende Proteine. Wasserhyazinthen sind bekannt für ihre Fähigkeit, in für andere Pflanzen letalen Konzentrationen von Schwermetallen zu wachsen, ja diese Metalle in den Wurzeln aus dem Medium anzureichern. Daneben ist diese Pflanze wegen ihres extremen Wachstums für die Biomassenproduktion interessant. Über 70 % des aufgenommenen Cd waren in der Cytosolfraction lokalisiert. Die Cd-bindenden Komponenten eluierten in der Sephadex G-50 Chromatographie an Positionen, die Molekulargewichten von 3000 bzw. 2300 Da entsprachen. Die spektroskopischen Eigenschaften dieses Materials entsprachen dem von MT, die nicht komplette Restaurierbarkeit der Absorption bei 250 nm nach Ansäuern wurde im Bezug zu entsprechenden Befunden von Murasugi et al. (1983) gesetzt, aber nicht - wie dort - mit freiem Sulfid in Zusammenhang gebracht.

Grill et al. (1985 a) isolierten aus Zellkulturen von Rauwolfia serpentina ein durch Cd^{2+} induzierbares, Cd-bindendes Material, das in vielen Charakteristika (UV- und CD-Spektren, hochanionischer Charakter, M_r von 3,6 bzw. 2,5 kDa) den vorerwähnten Komplexen ähnlich war. 100 - 200 mg des mehr als 98% reinen Materials wurden aus 1 Kg Frischgewicht Cd-exponierten (200 µM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) Gewebes gewonnen. Mehr als 90% des in den Zellen vorhandenen Cd^{2+} eluierten auf Sephadex G-50 in einem intermediären Bereich. Dieses Material war

stark induzierbar: der SH- Gehalt der Zellen stieg ca. 6fach an (Grill et al. 1985b), während der Cd-bindende Komplex von unter der Nachweisgrenze bis auf 3 Größenordnungen darüber induziert wurde. Präpariert wurde das Material mit Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Biogel, 80% sat. Ammoniumsulfatfällung (der effektivste Reinigungsschritt, der Cd-bindende Komplex bleibt im Überstand), Ultrafiltration an Amicon YM-2 und Sephadex G-50 Gelchromatographie. Dies wird hier erwähnt, weil die Reinigung durch Ammoniumsulfatfällung einen Unterschied zu allen anderen Reinigungsprotokollen darstellt. Die damit erzielte hohe Reinheit war Voraussetzung für die Sequenzierung des Liganden. Die Komplexe, die mit Cu^{2+} , Pb^{2+} und Zn^{2+} induziert werden konnten, wurden ebenfalls aus R. serpentina isoliert. HPLC (reversed-phase Ionenaustauschchromatographie) trennte das Material in mehrere Peptide auf. Deren Sequenzanalyse stellt eine Meisterleistung dar, denn es war kein Edman-Abbau möglich. Hydrazinolyse des Carboxyterminus lieferte freies Glycin. Die Vermutung, das Versagen des Edman-Abbaues bei freiem N-Terminus bedeute eine modifizierte Peptidbindung, wurde durch Abbau mit γ -Glutamyltransferase bestätigt. 1 mol L-Glu / mol Peptid wurde freigesetzt. Ein modifizierter Edmann-Abbau dieses Restpeptids setzte 1 mol L-Cys / mol Peptid frei. Wiederholte Anwendung dieser Schritte führte schließlich zur korrekten Sequenz:



Phytochelatin

Der Name Phytochelatin (PC) wurde dem Satz homologer Peptide wegen des Vorkommens in der höheren Pflanze und wegen der Schwermetall-komplexierenden Eigenschaft gegeben. Partialhydrolyse und zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der dinitrophenylierten Peptide ergab einen charakteristischen Satz von gelben (intakter Aminoterminus) Flecken, deren Aminosäurezusammensetzung anhand der Absorption des DNP-Restes quantifiziert wurde, und die Struktur bestätigte.

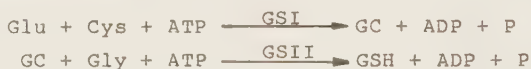
Cadmiumbindende Komplexe mit demselben Satz homologer Phytochelatin-Peptide wurden auch aus Zellkulturen von Rosa canina, Silene cucubalus, Anetum graveolens, Berberis stolonifera, Catharantus roseus, Fumaria parviflora, Galium mollugo, Malva sylvestris, Solanum marginatum, Rhazya stricta, Thalictrum dipterocarpum und Dioscorea composita isoliert. Das wiederholte Auftreten von γ -Glutamylbindungen zeigt, daß PC nicht als direktes Genprodukt, sondern vermutlich enzymatisch, möglicherweise aus Glutathion (GSH) oder γ -Glutamylcystein synthetisiert wird. Dafür spricht auch der Befund, daß die Synthese ohne erkennbare Verzögerung mit konstanter Rate einsetzt (Grill et al. 1985 b).

Diese bahnbrechenden Entdeckungen widersprechen allen vorerwähnten Untersuchungen über pflanzliche MT-ähnliche Proteine. Lediglich Kondo et al. (1984) berichteten von zwei Cd-induzierbaren und Cd-bindenden Peptiden aus Schizosaccharomyces pombe, die sie Cadystin a und b genannt hatten, und deren Struktur nach mehreren Revisionen mit den von Grill (1985 a) gefundenen Phytochelatinen mit n=3 resp. n=2 aus R. serpentina identisch ist.

Eine Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit ist es daher, die Identität der Schwermetall-bindenden Komplexe aus verschiedenen Pflanzen mit Phytochelatinen nachzuweisen und das Vorkommen dieses grundsätzlich von dem Schwermetallkomplexierungsmechanismus des Tierreichs, nämlich MT-Synthese, unterschiedenen Komplexierungsmechanismus im Pflanzenreich zu untersuchen. Es muß untersucht werden, ob vielleicht einzelne Arten oder ganze Ordnungen kein PC synthetisieren können und damit als Objekt für Komplementationsstudien zur Verfügung stehen. Ferner werden zur Massenisolierung von PC Überproduzenten gesucht, die vielleicht bei Schwermetalltoleranten Pflanzen gefunden werden könnten. Auch der Zusammenhang der PC-Synthese mit der Schwermetall-Toleranz mußte untersucht werden.

I.6 Phytochelatine und Glutathion

Da sich das PC mit seinen wiederholten γ -Glutamylbindungen und dem formal einem Glutathion entsprechenden Carboxyl-Terminus möglicherweise aus dem Glutathionstoffwechsel ableitet (Grill et al. 1985 a), mußte auch die pflanzliche Glutathionbiosynthese und deren Zusammenhang mit der PC-Biosynthese untersucht werden. Deshalb sollen im Folgenden Glutathionbiosynthese und -Stoffwechsel näher betrachtet werden. Erste Arbeiten der Arbeitsgruppe um Bloch (Johnston und Bloch, 1949; Snoke und Bloch, 1952; Yanari, Snoke und Bloch, 1953; Snoke, Yanari und Bloch, 1953) untersuchten die Biosynthese von GSH in zellfreien Extrakten aus Schweineleber und Bäckerhefe. Sie wiesen nach, daß GSH in zwei aufeinanderfolgenden, ATP-abhängigen Reaktionen aus den Aminosäuren aufgebaut wird.



In diesen Gleichungen bedeuten: GC = γ -Glutamylcystein, GSH = Glutathion, GS I = γ -Glutamylcysteinsynthetase (EC 6.3.2.2) und GS II = Glutathionsynthetase (EC 6.3.2.3).

In der Folge wurden GSH-Biosynthesesoenzyme aus verschiedensten Organismen gereinigt und charakterisiert. Die Arbeitsgruppe um Meister hat diese Ergebnisse zusammengefaßt und Standard-Reinigungsprotokolle entwickelt. Mooz und Meister (1971) reinigten GS I aus Schweineleber. Das Enzym ist spezifisch für L-Glu, statt Cys akzeptiert es ABA, Ala, Thr, Met, Ser, Val, jedoch nicht Hydroxylamin. Für die Reaktion war kein K^+ , aber Mg^{2+} oder Mn^{2+} nötig. Als reichste Quelle für GS I erwiesen sich Rattennieren (Orlowski und Meister, 1971), Das Enzym zeigte starken Aktivitätsverlust bei Einfrieren oder Dialyse, auch die Aufbewahrung in Mercaptoethanolhaltigen Puffern inaktivierte das Enzym. Eine einmalige Reaktivierung war durch Inkubation mit 5 mM DTT für kurze Zeit möglich, nach 2 Tagen war dann allerdings die Aktivität endgültig zerstört. Dies und die Tatsache, daß SH-Reagentien

(p-Chlor-Mercuribenzoat, N-Ethyl-Maleimid) das Enzym hemmen, wurde dahingehend interpretiert, daß das Enzym sowohl eine für die Aktivität essentielle SH-Gruppe als auch für die Stabilität wichtige Disulfidbrücken enthält. Ähnlich wie die Glutaminsynthetase katalysiert die GS I die Zyklisierung von D- und L-Glu. Ebenfalls gemeinsam haben die beiden Enzyme ein enzymgebundenes Acylphosphat als Zwischenprodukt, das isoliert werden konnte. Das pH-Optimum ist bei pH 8,4; die KM-Werte liegen im millimolaren Bereich: Glu 1,6; Cys 1,3; ATP $0,2 \times 10^{-3}$ M. Weitere Untersuchungen zu diesem Enzym wurden von Seelig und Meister (1985) durchgeführt. Die Reinigung wurde durch Affinitätschromatographie an ATP-Hexyl-Agarose verbessert. Die Aufbewahrung bei 5°C in Imidazolpuffer + EDTA, ohne Oxidationsschutz, verbesserte die Stabilität. Das Molekulargewicht wurde zu 104000 Da (73000 + 28000) bestimmt.

GS I wird feedback-gehemmt durch GSH (KI 2,3 mM). Nach Seelig und Meister (1985) ist die GSH-analoge Ophthalminsäure (mit α -Aminobuttersäure statt Cys) ein viel schwächerer feedback-Inhibitor der GS I. Die nicht-allosterische Hemmung durch GSH involviert Bindung sowohl an die Glutamat-Bindungsstelle des Enzyms als auch an eine weitere, nicht näher identifizierte Bindungsstelle. L-Buthionin-S-Sulfoximin, ein "dead end" -Substrat, ist der effektivste Inhibitor (KI für 5 mM Glu: 1 μ M) mit gleichzeitig der höchsten Spezifität für dieses Enzym (Griffith und Meister, 1979, Griffith, 1981).

Die Glutathionsynthetase (GS II) wurde zuerst von Johnston und Bloch (1951) aus Leber, dann von Snoke aus Hefe (1955) und unter Anderen auch von Mooz und Meister (1979) aus Hefe isoliert. Das Molekulargewicht wurde zu 123000 Da bestimmt, die KM-Werte wurden angegeben: γ -Glutamylaminobutyrat 0,5 mM, ATP 0,1 mM und Gly 2,0 mM. Das Enzym setzt als Dipeptidsubstrat hochspezifisch nur γ -Glutamyl-cystein und -Aminobutyrat um, als Akzeptorsubstrat ist außer Gly nur

Hydroxylamin beschrieben. β -Alanin, Asp oder Ala gaben keine Reaktion. In Analogie zur Glutaminsynthetase und GS I ist auch für den Reaktionsmechanismus der GS II ein intermediäres, enzymgebundenes Acylphosphat wesentlich, das isoliert werden konnte (Meister 1985). Bei Anwesenheit katalytischer Mengen Nukleotid, Phosphat oder Arsenat katalysiert das Enzym auch die Hydrolyse von GSH oder die Übertragung von GC auf Hydroxylamin oder Gly, was bei der Aktivitätsbestimmung durch Messung des gebildeten GSH bedacht werden muß. Das Enzym benötigte zur Aktivität Mg^{2+} - und K^{+} -Ionen. Von Meister (1985) wurde das Enzym auch aus Rattennieren gereinigt beschrieben. Das Molekulargewicht von 118000 Da addiert sich aus 2 offenbar identischen Untereinheiten von 59000 Da. Für die Aktivität essentielle SH-Gruppen werden durch SH-Reagentien, z.B. p-Chlormercuribenzoat gehemmt. Die KM-Werte wurden nach unten korrigiert: γ -Glutamylcystein 50 μM , γ -Glutamylaminobutyrat 20 - 200 μM , Gly 0,76 mM und ATP 33 μM . Für die GS II ist kein spezifischer Hemmstoff beschrieben worden.

Durch Selektion GSH-Synthese defizienter E. coli-Stämme mit Hilfe von Tetramethyl-Thiuramdisulfid und Komplementierung dieser Stämme zu Toleranz gegen dieses Pesticid mit Klonen genomischer DNA war es Murata und Kimura (1982) gelungen, die Gene für GS I und GS II aus E. coli zu isolieren und auf Plasmiden zu klonieren. Beide Gene wurden auf einem Plasmid, das gleichzeitig für Chloramphenicolresistenz codierte, vereinigt und in einen Stamm von E. coli eingebracht (Gushima et al., 1983 a). In diesem E. coli-Stamm (C 600) war das Plasmid (pGS 500) bei Kultur mit 20 mg/l Chloramphenicol stabil, die Glutathionsynthese war 14-fach bis 16-fach gesteigert, vermutlich durch den Gendosiseffekt.

Gushima et al. (1983 b) isolierten die GS II aus diesem Organismus in 8,5 facher Ausbeute mit 60-facher Anreicherung. Das Enzym hatte ein Molekulargewicht 152000 Da und bestand aus 4 identischen Untereinheiten, M_r 38000 Da.

Die GS I wurde von Watanabe et al. (1986) aus dem gleichen Stamm von E. coli isoliert. Das Enzym mit einem von eukaryontischer GS I deutlich unterschiedenen Molekulargewicht von 55000 Da wurde 220-fach angereichert, bei einer Ausbeute von 3,7 % . Im Unterschied zu eukaryontischer GS I wurde das Enzym durch GSH, Buthionin-Sulfoximin oder Methionin-Sulfoximin nicht gehemmt. Das Temperaturoptimum (45°C) und pH-Optimum (pH = 8,5) waren für beide Enzyme gleich, ebenso wie das optimale Verhältnis von Mg^{2+} zu ATP von 2.

Arbeiten von Webster (1953) und Webster und Varner (1954 a, 1954 b) beschäftigten sich mit Glutathionbiosynthese in höheren Pflanzen. In Homogenaten aus Bohnenkeimlingen (Webster 1953) wurde GSH-Synthese festgestellt. Dabei wurde das Tripeptid angeblich auch ohne Zugabe von ATP und Gly, nur mit endogenem Gly, synthetisiert. Mit radioaktiv markiertem Glu wurde festgestellt, daß der Glutamylrest des GSH durch den Rohextrakt rasch ausgetauscht wurde. Durch Zugabe von Krebszyklusintermediaten oder ATP wurde die Syntheserate erhöht. In Zellfraktionierungsstudien war ein erheblicher Teil der Syntheseaktivität in Mitochondrien lokalisiert. Durch Acetonextraktion weiter gereinigte Fraktionen benötigten außerdem Mg^{2+} und K^+ sowie ATP zur Tripeptidsynthese. Die Syntheserate von Tripeptid aus Cysteinylglycin und Glutamat war sehr viel geringer, die Syntheserate aus γ -Glutamylcystein und Glycin größer als die Syntheserate aus den freien Aminosäuren.

Bei der Reinigung der Glutathionbiosynthese-Enzyme aus Weizenschrot (Webster und Varner 1954 a, 1954 b) wurden die jeweils andere Synthetase, ATPase sowie ein Glutamylcysteinhydrolisierendes Enzym abgetrennt. Die Enzyme wiesen ein pH-Optimum zwischen 7 und 8 auf und benötigten Magnesium- und Kaliumionen. Die Einzelreaktionen der GSH-Biosynthese in Pflanzen und Tieren entsprechen sich also.

Für die Untersuchungen über den Zusammenhang der PC-Synthese mit dem Glutathionstoffwechsel ist es wichtig, die intrazelluläre GSH-Konzentration verändern zu können. Der GSH-Spiegel in Zellen von Säugetieren (Mäuse und Ratten) wurde künstlich verändert: mit 4 mM Buthionin-Sulfoximin im Medium wurde in Erythrocyten innerhalb von 2 h 90 % Hemmung des Einbaus von ^{35}S -Cys erreicht (Griffith 1981). Eine Depletion von GSH ist aber frühestens nach 6 - 8 h sichtbar, da die Halbwertszeit des GSH in Erythrocyten von 4 - 6 Tagen recht groß ist. Buthionin-Sulfoximin wird in Mäusen und Ratten nicht signifikant metabolisiert und hat, außer der Absenkung des GSH-Spiegels, keinen anderen hemmenden Effekt (Anderson und Meister, 1985).

Der intrazelluläre GSH-Spiegel kann, bei intakter GS I, auch durch Erhöhung des Cys-Spiegels erhöht werden, da diese Aminosäure meistens die Synthese begrenzt (Heinle et al., 1976, Williamson und Meister, 1981). Ein Analog des 5-Oxoprolins, das L-2-Oxothiazolidin-4-Carboxylat (OTC) wird von der Zelle aufgenommen und vom Enzym Oxoprolinase gespalten. Aus Oxoprolin entsteht dabei in ATP-abhängiger Reaktion Glu, aus OTC entsteht Cys (Williamson und Meister, 1981). Diese Experimente wurden an Mäusen und Ratten durchgeführt; im Säugetierorgansimus ist extern zugegebenes Cys in nennenswerten Konzentrationen toxisch, deshalb hat dieses System besondere Bedeutung.

Methioninsulfoximin, das neben GS I auch die Glutaminsynthetase hemmt, wurde von Meister und Tate (1976) als effektiver Hemmstoff für die GSH-Synthese erkannt. Rennenberg und Uthemann (1980) untersuchten die Wirkung von Methioninsulfoximin auf Tabak-Suspensionskulturzellen. 10^{-8} M Methioninsulfoximin reichten aus, um 50 % Wachstumshemmung zu erreichen. Dem Medium zugegebenes GSH und Glutamin konnten die Wachstumshemmung aufheben. Dies zeigte, daß der Hemmstoff, der in Tieren die GSH-Biosynthese hemmt, auch in Pflanzenzellen wirksam ist, und daß - im Gegensatz zu tierischen Systemen - die Pflanzenzellen das Glutathion ohne weiteres aus dem

Medium aufnehmen können. Die Beobachtung, daß nur 2 % von den ca. 10 μ M Cys in Pflanzenzellen rasch umgesetzt werden (Giovanelli et al., 1978) legt den Schluß nahe, daß die Syntheserate des GSH in Pflanzenzellen von der begrenzenden Konzentration an Cys weit unter dem KM des Enzyms bestimmt wird.

Ausgehend von diesen Befunden sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die von Grill et al. (1985 a) in einigen Pflanzensuspensionskulturen nachgewiesenen Phytochelatine ein für das Pflanzenreich allgemein gültiger Schwermetall-Komplexierungsmechanismus sind. Die Identität der Schwermetall-Komplexe in Suspensionskulturen und differenzierten Pflanzen sollte gezeigt werden, besonders im Hinblick auf die von anderen Autoren als Proteine beschriebenen Liganden. Auch galt es zu untersuchen, ob eventuell Sporophyten und Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze und Algen diesen Mechanismus zur Entgiftung von Schwermetallen verwenden. Der Zusammenhang der PC-Synthese mit dem GSH-Stoffwechsel sollte genauer untersucht werden. Fütterungs- und Hemmstoffexperimente sollten Aufschluß über die Substrate geben, und das/die PC-synthetisierende/n Enzym/e möglicherweise isoliert werden. Stoffwechselphysiologische Experimente sollten die Wirkung von PC-Komplexen in der Nahrung untersuchen.

II. Material und Methoden

II.1 Biologisches Material

II.1.1 Pflanzenzellkulturen

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten pflanzlichen Zellsuspensionkulturen wurden vom hauseigenen Zellkulturlabor erhalten, dem an dieser Stelle mein Dank ausgesprochen sei. Die Suspensionskulturen wurden in entsprechenden Medien in einem thermostatisierten Raum mit 70 % Luftfeuchtigkeit und 23°C bei Dauerlicht (600 lux) und 100 U/min (New Brunswick Schüttler) kultiviert. Es wurden folgende Medien verwendet:

B 5, nach Gamborg et al. (1968);

LS, nach Linsmaier und Skoog (1965);

MS, nach Murashige und Skoog (1962);

4 x, B5 modifiziert nach Ulbrich und Zenk (1979): + 0,2% NZ-Amine (Aldag, Hamburg), 10^{-5} M 2,4-D, 3×10^{-6} M Naphthylessigsäure, 3×10^{-6} M Indolessigsäure und 10^{-6} M Kinetin; und DAX, wie B5, jedoch mit 0,2% NZ-Aminen und 10^{-5} M 2,4-Dichlor-Phenoxyessigsäure.

II.1.2 Hydrokultur von Pflanzenkeimlingen

Die in dieser Untersuchung verwendeten differenzierten Pflanzen konnten aus Samen gezogen werden, die vom Botanischen Garten, München; von der Fa. Samen-Schmitz, München; vom Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Regensburg, Herrn Dr. G. Rossmann; und über Dr. G. Rossmann von verschiedenen Botanischen Gärten des In- und Auslandes bezogen wurden. Hartschalige Samen wurden über Nacht in Leitungswasser vorgequollen, dann wurden die Samen auf Zellstoff in Petrischalen in einem Klimaschrank bei 27°C und Dauerlicht, Dunkelkeimer vor Licht geschützt, zum Keimen ausgelegt. Sobald sich die Keimblätter zu entfalten began-

nen, wurden die Keimlinge auf Styroporflößen, mit den Wurzeln durch Löcher in denselben ins Medium ragend, in einem Klimaschrank kultiviert (1200 lux, 12 h/Tag und 0,5 l Preßluft/h x 1 Nährlösung, 27°C, 98% rel. Luftfeuchtigkeit). Die Pflanzen wurden zur Induktion der PC-Synthese mit 20 - 50 μM Cd^{2+} für 4 - 12 Tage belastet. Gegebenenfalls wurden auch ältere Keimlinge oder bis zu einjährige Pflanzen, die in Erde gewachsen waren, sorgfältig von Erde befreit und auf diese Weise inkubiert. Als Medium (H) diente die Nährsalzlösung nach Hoagland und Snyder (1933). Für Versuche zur Hydrokultur von Wasserhyazinthe wurde das Medium 1 : 10 mit H_2O verdünnt. Diese Pflanze wurde auch nach der Vorschrift von Fujita (1985) kultiviert und belastet.

II.1.3 Kulturbedingungen für Sporophyten

In diesem und den folgenden Abschnitten werden die Inhaltsstoffe von Medien, die nicht zur Standardausrüstung des Gewebekulturlabors am Lehrstuhl Prof. Dr. Zenk gehören, im Einzelnen aufgeführt, um die Nachvollziehbarkeit ohne großen Aufwand an Literaturarbeit sicherzustellen.

Das Lebermoos Marchantia polymorpha wurde vom Botanischen Garten, München, zur Verfügung gestellt. Dieses Moos wurde auf Agarnährböden mit Medium nach White (1933) kultiviert. Eine Submerskultur des Mooses Physcomitrella patens (Hedw.) wurde von Professor W.O. Abel, Hamburg, zur Verfügung gestellt. Sporogone von Funaria hygrometrica wurden von Prof. Dr. M. Bopp, Heidelberg, erhalten. Beide Moose wurden submers in Knop-Nährlösung kultiviert (Bopp und Brandes 1964).

KH_2PO_4 250 mg/l

KCl 250 mg/l

$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 250 mg/l

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ 1000 mg/l

$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 12,5 mg/l.

pH = 5,8. Gegebenenfalls wurde das Medium mit 1,2 Gewichtsprozent Agar (Difco Bacto-agar) verfestigt. Die Thalli bzw.

Protonemen wurden mit einer Ultra-Turrax (IKA, Staufen) beim 2-wöchentlichen Überimpfen (10% Inoculum) zerkleinert.

Die Wasserfarne Marsilea quadrifolia und Azolla filiculoides sowie Pflanzen von Selaginella viticulosa und Equisetum giganteum wurden vom Botanischen Garten München zur Verfügung gestellt. Die differenzierten Pflanzen wurden in 1/10 Hoaglands Medium (Hoagland und Snyder 1933) kultiviert. Von Equisetum giganteum wurde von Frl. B. Rittgen eine Gewebekultur angelegt, die in DAX-Medium, wie für Zellkulturen höherer Pflanzen beschrieben, kultiviert wurde.

II.1.4 Algenkulturen

Die Algen Fragillaria crotonensis, Navicula pelliculosa, Chlamydomonas reinhardtii, Monoraphidium minutum und Stichococcus bacillaris wurden von Dr. N. Walz, Zoologisches Institut der Universität München, zur Verfügung gestellt. Diese Algen wurden in einem Medium nach Chu (1942) in einer Modifikation von Müller (1972) gezogen. Euglena gracilis Z-Stamm W. R. Evans, Scenedesmus acutiformis SAG 276-11 (Samm- lung von Algenkulturen, Göttingen, SAG), Porphyridium cruentum (SAG 1380-10), Synechococcus Wildtyp R 2-WT und Bumilleriopsis filiformis wurden von Prof. P. Böger, und Sargassum muticum (Isolat 1983, Langstone Harbour) von Prof. D. G. Müller; (Universität Konstanz), teilweise als Stämme, teilweise als belastete und unbelastete Kulturen bezogen und in den unten angegebenen Medien kultiviert. Chlorella fusca (SAG 211-8b) und Synechococcus I.P. (Institut Pasteur, Paris) 6437 wurden von Professor A. Schmidt, Botanisches Institut der Universität München, bezogen. Ihm sei an dieser Stelle mein besonderer Dank für die wiederholte Anzucht belasteter und unbelasteter Chargen von Clorella ausgesprochen. Diese Alge wurde nach Krauss und Schmidt (1987) in Kontrollmedium angezogen.

Wo nicht anders angegeben, wurde in den Medien aus Schlösser (1982) kultiviert.

Die Algenmedien im Einzelnen:

Chu 12 für Grünalgen und Kieselalgen:

Stammlösung A: 200 mg/l K_2HPO_4
200 mg/L KCl
800 mg/l Na_2CO_3
für Kieselalgen: + 3,44 ml/l Natronwasser-
glas

Stammlösung B: 1720 mg/l $Ca(NO_3)_2 \times 4 H_2O$
3000 mg/l $MgSO_4 \times 7 H_2O$

Spurenelemente: 1000 mg/l Na_2-EDTA
193,6 mg/l $FeCl_3 \times 6 H_2O$
36,1 mg/l $MnCl_2 \times 4 H_2O$
21,9 mg/l $ZnSO_4 \times 7 H_2O$
4,86 mg/l $Co(NO_3)_2 \times 6 H_2O$
9,2 mg/l $(NH_4)_6Mo_7O_{27} \times 4 H_2O$

Vitamine: 20 mg/l Vitamin $B_1 \times HCl$
2 mg/l Vitamin B_6
5 mg/l Vitamin B_{12}
5 mg/l Niacin
5 mg/l Ca-Pantothemat
1 mg/l Biotin
5 mg/l Thymin
1 mg/l Riboflavin
5 mg/l p-Aminobenzoesäure
0,1 mg/l Folsäure

25 ml Stammlösung A, 25 ml Stammlösung B und 1 ml Spurenelementlösung werden auf 1 l mit H_2O dest. aufgefüllt und nach dem Autoklavieren 1 ml Vitamine (sterilfiltriert) zugefügt.

E-NL für Euglena:

Stammlösung I: 90 g/l NH_4Cl ,
84 g/l $K_2HPO_4 \times 3H_2O$
50,4 g/l $NaH_2PO_4 \times H_2O$
13,5 g/l $(NH_4)_2SO_4$

Stammlösung II: 35 g/l $MgCl_2 \times 6 H_2O$

Stammlösung III: 944 mg $FeCl_2 \times 4 H_2O$, 1 ml HCl 37% in 200 ml.

Spurenelemente: identisch mit Stammlösung VI für Porphyridium

10 ml/l Stammlösung I, 20 ml/l Stammlösung II, 1 ml/l Stammlösung III und 1 ml/l Spurenelementlösung werden gemischt und nach dem Autoklavieren die sterilfiltrierten Vitaminlösungen (Vitamin B₁₂ 32 µg/l und Vitamin B₁ 3 mg/l) zugefügt. pH = 4,4 - 4,6.

P-NL für Porphyridium:

Stammlösung I: NaCl 135 g/l;

Stammlösung II: MgSO₄ x 7 H₂O 66 g/l und MgCl₂ x 6H₂O 56g/l

Stammlösung III: KNO₃ 100 g/l

KH₂PO₄ 0,4 g/l

K₂HPO₄ x 3 H₂O 20 g/l

NaHCO₃ 4 g/l.

Stammlösung IV: CaCl₂ 10 g/l

Stammlösung V (Eisenstammlösung): 1,39 g FeSO₄ x 7 H₂O und 1,86 g Na₂-EDTA. Die Substanzen werden erst einzeln gelöst und dann zusammengefügt.

Stammlösung VI (Spurenelemente):

5 g/l CaCl₂ 450 mg/l MnCl₂ x H₂O

325 mg/l Co(NO₃)₂ x 6 H₂O

55 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4 H₂O

25 mg/l Na₃VO₄ x 16 H₂O

125 mg/l H₃BO₃

45 mg/l ZnCO₃

5 mg/l CuSO₄ x 5 H₂O.

100 ml/l Stammlösung I, 10 ml/l Stammlösung II, 10 ml/l Stammlösung III, 10 ml/l Stammlösung IV, 0,2 ml/l Eisenstammlösung und 1 ml/l Spurenelementlösung werden gemischt und der pH vor dem Autoklavieren auf 7,6 - 7,8 eingestellt.

SS-Nährlösung für Scenedesmus und Synechococcus:

Stammlösung I: 100 g/l KNO₃

26 g/l Na₂HPO₄ x 2 H₂O

74 g/l KH₂PO₄

5 g/l MgSO₄ x 7 H₂O

Stammlösung II: 1,89 g CaCl_2 werden in 250 ml H_2O gelöst und
5 Tropfen konzentrierte HCl hinzugefügt.

Stammlösung III: 2,2 mg/l $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O}$
33,0 mg/l $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
0,93 mg/l $\text{CoSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
2,1 mg/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
10,2 mg/l H_3BO_3
0,6 mg/l $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_{70}\text{O}_{24} \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
0,97 mg/l NH_4VO_3
8,76 mg/l $\text{NiSO}_4 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
83 mg/l KJ
79 mg/l KBr
2,8 mg/l LiCl

Stammlösung IV: identisch mit Stammlösung V für Porphyri-
dium

Stammlösung V: 500 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$

10 ml/l Stammlösung I, 1 ml/l Stammlösung II, 3 ml/l Stamm-
lösung III und 5 ml/l Stammlösung IV werden gemischt. Diese
Mischung wird mit Cu^{2+} ergänzt: für Synechococcus: + 1 ml/l
Stammlösung V, pH = 7,8; für Scenedesmus: + 0,05 ml/L
Stammlösung V, pH = 6,3

Für Erhaltungskulturen (Schrägagar) wurden die Algenmedien
mit 5 g/l Glucose, 2,5 g/l Hefeextrakt und 20 g/l Agar
versetzt; für Euglena: 1 g/l Na-Acetat, 1 g/l Fleischex-
trakt, 2 g/l Trypton, 2 g/l Hefeextrakt und 10 g/l Agar.

II.1.5 Pilzkulturen

Eine umfangreiche Sammlung von Pilzstämmen wurde von Prof.
Dr. F. Oberwinkler, Tübingen, zur Verfügung gestellt.
Schizosaccharomyces pombe, Wildtyp L 972 H^- wurde von Prof.
Dr. Wolf, München, zur Verfügung gestellt. Weitere Schizo-
saccharomyceten und nahe verwandte Pilze wurden von der
Deutschen Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen, bezogen.
Eine weitere umfangreiche Sammlung von Pilzstämmen wurde von
Prof. Dr. A. Bresinsky, Universität Regensburg, zur Verfü-

gung gestellt. Es wurden folgende Medien verwendet:

HD: 20 g/l Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Glucose; pH=7,2.

MYP: 20 g/l Malzextrakt, 20 g/l Glucose, 20 g/l Pepton, 10 g/l Hefeextrakt; pH = 7,2.

Verdünntes Malzmedium MYP: Malzextrakt 7 g/l, 1 g/l Soytone (Difco), 0,5 g/l Hefeextrakt, ggf. 20 g/l Agar; H₂O dest. ad 1 l, pH = 7,2.

Universelles Hefemedium YM: 3 g/l Hefeextrakt, 3 g/l Malzextrakt, 5 g/l Pepton, 10 g/l Glucose, ggf. 15 g/l Agar; pH = 7,2.

Minimalmedium WO: 20 g/l Glucose, 5,7 g/l Ammoniumsulfat, 1,2 g/l Yeast Nitrogen Base (Difco); pH = 7,2.

Komplexes Medium nach Moser (1958), MB:

Maltose	20 g	Salze: 5 g/l KH ₂ PO ₄
Glucose	10 g	5 g/l MgSO ₄
Pepton	2 g	1 g/l CaCl ₂
(Agar	20 g)	100 mg/l FeCl ₃
Thiamin	50 µg	50 mg/l MnSO ₄
Biotin	1 µg	10 mg/l ZnSO ₄ .
Inosit	50 µg	
Salze	100 ml	

H₂O ad 1 l; pH = 7,0.

II.1.6 Bakterienkulturen

Belastete und unbelastete Kulturen von Halobacterium halobium und Rhodopseudomonas viridis wurden von Professor Dr. D. Oesterhelt, Marinsried, zur Verfügung gestellt. Escherichia coli WT, Enterobacter aerogenes, Alcaligenes eutrophus, Staphylococcus carnosus, Pseudomonas fluorescens und Bacillus subtilis wurden von W. Streber zur Verfügung gestellt. E. coli C 600 mit Plasmid pGS 500, das die Gene für Glutathionsynthetase I (nicht feedback-hemmbar durch GSH) und GS II in hoher Kopienzahl trägt, wurde von Prof. A.

Meister, Cornell Universität New York, bezogen. Die Bakterien wurden in Flüssig- oder Agarnährbodenkultur in HD-Medium, für E. coli pGS 500 mit 20 µM Chloramphenicol, gezogen.

II.1.7 Versuchstiere

Männliche Wistar Ratten des Stammes Neuherberg, 14 Wochen alt, wurden von der Tierzucht Abteilung der GSF, München, geliefert und dort unter Standardbedingungen gehalten.

Salinenkrebse der Art Anthemia salina wurden nach der Vorschrift des Herstellers (Vitakraft) in Leitungswasser mit 1,5% NaCl kultiviert.

II.2. Chemikalien

Medien zur Niederdruck-Chromatographie wurden von Fa. Pharmacia, Freiburg und Fa. BioRad, München bezogen. Lösungsmittel und Scintillatormischung Rotiscint 22 wurden von Fa. Roth, Karlsruhe, geliefert. Bioreagenzien wurden von Fa. Sigma, Taufkirchen und Fa. Boehringer, Mannheim, bezogen. Die übrigen Chemikalien waren, wenn nicht anders angegeben, p.A. Substanzen von Fa. Merck, Darmstadt und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

II.3 Geräte

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden folgende Geräte verwendet:

Spektralphotometer Uvikon 810 (Kontron) und "Microplate Reader" MR 600 (Dynatech, Alexandria, USA);
Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) No. 5412;
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B (DuPont, USA);
Ultrazentrifugen L8-55M und L2 (Beckman, München);
Durchlaufzentrifuge Labofuge 15.000 (Heraeus, Hanau);
Scintillationszähler LB 5004 und "TLC Linear Analyzer" LB 2821/LB 2823 (Berthold, Wildbad);

Gammazähler BF LB 5300 mit 1024-Kanal-Integrator Silena (Berthold, Wildbad) und Ganzkörperzähler (Eigenbau der GSF mit zwei 5 x 4 Zoll NaJ-Einkristallen, ND 4096 Integrator (Nuclear Data, Darmstadt) und Commodore PET);

Anlage zur Niederdruck-Flüssigchromatographie aus Pumpe Varioperpex 2120, Detektor Uvicord S 2138, Fraktionssammler Multirac 2111 und Recorder 2065 (Alle LKB, Gräfelfing; jetzt Freiburg);

Anlage zur HPLC -Gelfiltration aus Pumpe 2150, Detektor Uvicord SD 2158, Schreiber 2201, Säule Ultropac 2135-365 TSK G 3000 SWG (alle LKB) und Fraktionssammler Gilson 201 (Abimed, Langenberg);

Analytische HPLC-Anlage aus Pumpe 8700 und 8770, Detektor 8440, Integrator 4200 und Autosampler 8780 (alle Spectra - Physics, Darmstadt) mit Säulen 4,2 x 250 mm mit Nucleosil 10-C18 (Macherey und Nagel, Düren) oder LiChrosorb RP-18 7µ (Merck, Darmstadt);

Analytische HPLC-Anlage der Firma Waters (Eschborn) aus Pumpe M 510, Integrator 740, Detector 481 und Autosampler WISP 710 B;

Semipräparative HPLC-Anlage der Firma Waters (Eschborn) aus Pumpe M 600, Intergrator 740, Detektor 481 und Fraktions-sammler Superrac 2211 (LKB; Gräfelfing);

HPLC-Anlage mit Detektion von Radioaktivität im Eluat bestehend aus Pumpe M 660, Autosampler WISP 710 B (Waters, Eschborn) und Detektor BF 38nn (Berthold, Wildbad) mit Pumpe lpr (ProMinent, Darmstadt) und Apple IIe Rechner.

II.4 Analytische Methoden

II.4.1 Schwermetallbestimmung

Der Gehalt an Schwermetallen wurde generell mit der Atomabsorptionsspektralphotometrie (AAS) bestimmt. Dazu wurden 50 µl Probe mit 50 µl konzentrierter H₂SO₄ naß verascht (im Falle sulfatunlöslicher Schwermetalle mit HNO₃) und auf 1,5 ml aufgefüllt. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifu-

giert. Es kam ein Gerät der Firma Perkin Elmer (PE 300, später PE-1100 B) in Flammenmodus zum Einsatz. Die Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn H. Hartl, Anorganische Chemie der Universität München, durchgeführt.

II.4.2 Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden generell mit der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Dazu wurden 200 µl Reagens in jede Vertiefung einer 96-Topf-Microtiterplatte (NUNC) gegeben und 5 - 20 µl Probe hinzugefügt. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 570 nm bestimmt. Zur Kalibrierung wurden 1 - 40 µg Rinderserumalbumin als Standard eingesetzt. In Einzelfällen wurde auch die Methode von Lowry et al. (1951) in der Modifikation nach Bensadoun und Weinstein (1976) eingesetzt.

II.4.3 Nachweis von SH-Gruppen

SH-Gruppen wurden mit Ellmans Reagens (Ellman 1959), Dithio-bis-Nitrobenzoesäure (DTNB, Fa. SERVA) nachgewiesen.

Reagens: 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,3

10 mM EDTA

3 mM DTNB

Zur Messung wurden je 200 µl Reagens in Mikrotiterplatten (Nunc, USA) pipettiert und Probe und H₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 250 µl hinzugefügt. Nach 10 Minuten wurde mit einem geeigneten Photometer (Dynatec, USA) die Absorption bei 410 nm bestimmt. Die Meßwerte veränderten sich über eine Stunde hinweg nicht signifikant (Grill, 1987), so daß die Luftoxidation zu vernachlässigen war. Das gelbgefärbte reduzierte Reagens hat einen molaren Extinktionskoeffizienten von $1,4 \times 10^4 / \text{M} \times \text{cm}$ bei 410 nm (Riddles et al. 1983). Zur Kalibrierung der SH-Bestimmung diente frisch aufgelöstes Cystein von 1-50 nmol/Test.

II.4.5 Derivatisierung von SH-Gruppen

SH-haltige Aminosäuren und Peptide mußten zur Auftrennung als einzelne Flecken in der DC und zur Abtrennung von Glu-Cys von GSH auf der HPLC am Schwefel derivatisiert werden. Dazu wurden folgende drei Verfahren eingesetzt (SH-Gruppen wurden ggf. mit NaOH/NaBH₄/HCL wie unter "Schnellaufschluß-methode" beschrieben frisch reduziert und auf pH 8 eingestellt):

II.4.5.1 Derivatisierung mit Monobrombiman

Das Reagens Monobrombiman (Calbiochem, Frankfurt) wurde als 100 mM Stammlösung in Acetonitril eingesetzt und die Thiole in den Proben nach Newton et al. (1981) derivatisiert.

1 µl Monobrombiman 100 mM

2 µl EDTA 100 mM

10 µl 100 mM NH₄HCO₃ pH 8

+ 90 µl Probe mit maximal 50 nmol SH

wurden gemischt und 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurde mit einem dreifachen Überschuß an Mercapto-Ethanol restliches Reagens abgesättigt.

II.4.5.2 Reaktion mit N-Ethyl-Maleimid

Nach Gutcho und Lauffer (1954) und Price (1957) wurden SH-Gruppen mit N-Ethyl-Maleimid derivatisiert.

Wässrige, SH-haltige Proben (Referenzsubstanzen: 10 mM Endkonzentration) wurden mit 1/10 des Volumens an N-Ethyl-Maleimid (10 mg/ml H₂O) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde überschüssiges N-Ethyl-Maleimid mit Mercapto-Ethanol (5 µl/ml) abgefangen.

II.4.5.3 Oxidation mit Perameisensäure

Nach Hirs (1956) konnten Cysteinreste quantitativ in die Cysteinsulfonsäurederivate überführt werden. Dazu wurden 1

Volumen 30% H_2O_2 und 9 Volumen konzentrierte Ameisensäure eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und mit dem zweifachen Volumen an Probe in Perameisensäure gelöst versetzt. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis wurde die Ameisensäure im Stickstoffstrom, weiterhin auf Eis, abgelassen. Durch wiederholtes Auflösen in 50 % EtOH und Abblasen im Stickstoffstrom konnte die Säure vollständig entfernt werden.

II.4.6 DC von Aminosäuren und Peptiden

Alle in dieser Arbeit untersuchten Aminosäuren und Peptide konnten auf Kieselgelplatten (Merk Nr. 5748) im Laufmittel: n - Propanol: NH_4OH 25 %ig: H_2O = 4:1,5:1 chromatographiert werden. Für DNP-Peptide war das Mischungsverhältnis 5:1,5:1. 1 - 10 nmol Aminosäure oder Peptid pro Fleck konnten mit Ninhydrinreagenz (300 mg Ninhydrin + 3 ml Essigsäure + 97 ml EtOH) detektiert werden. Zum Nachweis des Schwermetalls in Peptidkomplexen wurden die Dünnschichtplatten mit einer Lösung von 0,1 % Dithizon in CCl_4 besprüht. Radioaktivität wurde mit einem Scanner (Berthold, Wildbad) lokalisiert.

II.4.7 Zweidimensionale DC von partialhydrolysiertem DNP-PC ("fingerprint"-Analyse)

Diese Methode wurde von Grill (1987) und Grill et al. (1985 a) beschrieben. Dinitrofluorbenzol (Sangers Reagens, DNFB) reagiert selektiv und in hydrolysestabiler Weise mit Aminogruppen. Freie Aminogruppen, z.B. der aminoterminalen Aminosäure eines Peptides können auf diese Weise markiert und als gelbes Dinitrophenylderivat nachgewiesen werden (Sanger 1949). Durch limitierte, saure Hydrolyse von Dinitrophenyl-(DNP-)Peptiden werden einzelne Peptidbindungen zufällig gespalten und ein Gemisch aller möglichen Peptidfragmente erhalten. Die Fragmente mit intaktem Aminoterminus sind durch die gelbe DNP-Gruppe zu erkennen. Auftrennung durch zweidimensionale DC liefert ein charakteristisches Muster von gelben Flecken aus PC. Die Flecken werden mit 50% Ethanol eluiert, die Absorption der DNP-Gruppe bei 360 nm be-

stimmt und die Aminosäuren nach Totalhydrolyse mit 6N HCl bestimmt. Die Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Fragmente bzw. deren Unterschied von Fragment zu Fragment ergibt die Sequenz des Ausgangs-peptids (Grill 1987).

II.4.7.1 Derivatisierung mit Sanger-Reagens

Die folgende Reaktion wurde unter Lichtschutz durchgeführt, da die Derivate lichtempfindlich sind. 1 μ mol Peptid, mit Perameisensäure oxidiert, wurde mit 180 μ l Puffer (H_2O : - Ethanol:Triethylamin = 5:5:1) versetzt und danach 20 μ l 1,5 % ethanolische DNFB- (Sangers Reagens, Sanger (1945); Fa. Sigma) -Lösung zugefügt. Die Reaktion wurde bei 60°C für 30 Minuten ausgeführt. Danach wurde die Probe im Luftstrom zur Trockene eingeeengt, erneut im Puffer aufgelöst und erneut mit Reagens versetzt. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt und nach erneutem Trocknen der Ansatz mehrmals in 50% Ethanol gelöst und wieder zur Trockene eingeeengt, um überschüssiges Triethylamin zu entfernen. Danach wurde der Rückstand in 200 μ l H_2O gelöst und durch mehrmaliges Ausschütteln mit Ether überschüssiges Reagens extrahiert.

II.4.7.2 Partialhydrolyse von PC-Peptiden

Peptide wurden perameisensäureoxidiert und mit DNFB derivatisiert wie beschrieben. Das getrocknete Peptidmaterial wurde mit 100 μ l 1 N HCl versetzt und 18 Minuten im kochenden Wasserbad hydrolysiert. Danach wurde die Probe auf Eis abgekühlt und weiter bei 0°C gehalten, die Säure im Luftstrom abgeblasen und durch mehrmaliges Aufnehmen und wieder Eintrocknen in 50 % ethanolischer Lösung die Säure vollständig entfernt.

II.4.7.3 Zweidimensionale DC von Peptidfragmenten

Das Hydrolysegemisch aus II.4.7.2 wurde in 10 μ l 50 % Ethanol aufgenommen und punktförmig in eine Ecke, 3 cm von jedem Rand entfernt, einer Kieselgelplatte (20 x 20 cm, Merk Nr.

5748) aufgetragen. Die Kieselgelplatte war zuvor durch Besprühen mit Laufpuffer (12 % Essigsäure, 2,6 % Ameisensäure in H_2O) gleichmäßig durchfeuchtet worden. Nach dem Auftrag wurde noch einmal vorsichtig mit Laufpuffer besprüht. Die Gelplatte wurde auf die horizontale, wassergekühlte (12°C) Platte des Elektrophoreseapparats (CAMAG, Muttentz) gelegt und die Elektrodentröge über Papierbrücken, die mit Laufpuffer durchfeuchtet wurden, mit der Gelplatte verbunden. Die Elektrophorese erfolgte für eine Stunde bei 20 V/cm. Bei dem eingestellten pH-Wert von ca. 2 bestimmen im wesentlichen die Cysteinsulfonsäure-Gruppen ($pK = 1$) der Peptide und über deren Anzahl auch die Länge der Peptide deren Mobilität in Richtung Anode. Die Carboxyl-Gruppen ($pK = 2,6$) der Peptide liegen weitgehend undissoziiert vor. Nach beendeter Elektrophorese wurde in der zweiten Dimension eine DC im Laufmittel n-Propanol: 25 % $NH_4OH:H_2O$ 5:1,5:1 durchgeführt. Hierbei werden die Peptide mit der geringsten Kettenlänge am stärksten eluiert. Die als gelbe Flecken sichtbaren DNP-Peptide (intakter Aminoterminus) wurden mit dem Gelmaterial von der Platte geschabt und mit 50 % Ethanol eluiert. Die Absorption bei 360 nm wurde bestimmt, danach wurden die Fragmente totalhydrolysiert (siehe II.4.8). In den totalhydrolysierten Proben wurde die Aminosäurezusammensetzung bestimmt (II.4.8). Durch Bezug auf die vorher gemessene Absorption der DNP-Gruppe bei 360 nm konnte die Aminosäurezusammensetzung der Fragmente quantitativ bestimmt werden.

II.4.7 Enzymatisch-chemische Sequenzierung

Eine von der "fingerprint"-Analyse unabhängige Sequenzierungsmethode für PC-Peptide stellt die abwechselnde Anwendung von γ -Glutamyltranspeptidase und modifiziertem Edmanabbau dar. Diese Methode wurde von Grill (1987) beschrieben und in Zusammenarbeit mit E. Grill zur Sequenzierung von PC-Peptiden aus Chlorella fusca eingesetzt.

II.4.7.1 Abspaltung des -Glutamylrestes

Das Enzym γ -Glutamyltranspeptidase spaltet spezifisch aminoterminaler γ -Glutamylreste aus Peptiden ab (Connell und Adamson 1970). Dazu ist die Entfernung von 2-wertigen Kationen durch Zugabe von EDTA und eine geringe Ionenstärke im Ansatz Voraussetzung.

100 nmol PC-Peptid (durch HPLC gereinigt) wurden in 100 μ l Ansätzen mit 10 mM Phosphatpuffer pH 7,5, 5 mM EDTA und 1 unit γ -Glutamyltranspeptidase aus Rinderniere (SERVA, Heidelberg; reinst) 30 min. bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze 5 min. im kochenden Wasserbad erhitzt, ausgefallenes Protein abzentrifugiert und die freigesetzte Glutaminsäure mittels Aminosäureanalyse quantifiziert.

II.4.7.2 Modifizierter Edmanabbau

Mit der Methode von Chang (1983) wird eine hochempfindliche und rasche Bestimmung aminoterminaler Aminosäuren erreicht. Der wesentlichste Unterschied zum Edmanabbau liegt in der Verwendung eines modifizierten Reagens: 4-Dimethylaminoazobenzol-4-Isothiocyanat (DABITC).

In ausgeglühten Glasröhren (0,6 x 10 cm) mit dicht schließenden Plastikstopfen wurden 10 nmol des Restpeptids aus II.4.7.1 im Stickstoffstrom zur Trockene eingengt. Alle weiteren Schritte wurden unter Stickstoffdurchgeführt. 40 μ l H₂O, 40 μ l DABITC in Pyridin (frisch aufgelöst, 2,8 mg/ml) und 40 μ l Pyridin wurden zugefügt und das verschlossene Röhrchen 50 min. bei 52°C inkubiert. Danach wurden 10 μ l Phenylisothiocyanat zugefügt und für weitere 30 min. bei 52°C inkubiert. Überschüssiges Reagens wurde durch 6maliges Ausschütteln mit n-Heptan/Ethylacetat (2:1) entfernt. Die wässrige Phase wurde im Exsiccator zur Trockene eingengt. 50 μ l Trifluoressigsäure (wasserfrei) wurden zugefügt, 15 min. bei 52 °C inkubiert und der Ansatz wieder eingetrocknet. Der Rückstand wurde in 50 μ l H₂O aufgenommen und das abgespaltene Aminosäurederivat mit 200 μ l Butylacetat

extrahiert. Die wässrige Phase wurde für einen erneuten Abbauzyklus zurückbehalten, die organische Phase eingetrocknet und in 60 µl HCl-gesättigter Essigsäure:H₂O 2:1 50 min. bei 52 °C inkubiert. Nach Eintrocknen im Exsiccator wurde der Rückstand in 0,5 µl Ethanol gelöst und auf eine 2,5 x 2,5 cm Polyamid-Dünnschichtplatte (Schleicher und Schüll, Polyamid F 1700, Nr. 356 000) aufgetragen. Auf die entsprechende Stelle der Rückseite der beidseitig beschichteten Dünnschichtplatte wurde eine Probe von Standard-Aminosäurederivaten aufgetragen. Die Chromatographie wurde zweidimensional durchgeführt: 1. Essigsäure:H₂O 1:2; 2. Toluol:Essigsäure:n-Hexan 2:1:1. Die Aminosäurederivate wurden durch kurzzeitige Inkubation in HCl-Gas als kirschrote Flecken sichtbar gemacht.

II.4.8 Totalhydrolyse und Aminosäureanalyse

Die Peptidprobe wurde in ausgeglühte Glasröhrchen (Fiolax; 0,6 x 10 cm, Schott, Mainz) eingetragen und mit Stickstoff zur Trockene eingengt. 500 µl 6N HCl (Pierce) wurden zugefügt und das Glasröhrchen unter Vakuum verschlossen. Die Hydrolyse wurde über Nacht (20 Stunden) bei 110°C durchgeführt. Nach Abkühlen wurde das Hydrolysat mit Stickstoff zur Trockene abgeblasen und in 500 µl Probenpuffer für die Aminosäureanalyse aufgenommen. Die Aminosäureanalysen wurden dankenswerterweise von Herrn Dr. W. Schartau, Zoologisches Institut der Univ. München, ausgeführt. Es kam ein Aminosäureanalysator Liquimat III der Fa. Kontron zum Einsatz.

II.4.9 Bestimmung von GSH

II.4.9.1 Dünnschichtchromatographie

GSH wurde in entproteinisierten Probelösungen über Cochromatographie auf Kieselgelplatten (siehe oben) mit authentischem GSH als freies Peptid, perameisensäureoxidiertes Peptid, oder mit N-Ethyl-Maleimid oder Monobrombiman deriva-

tisiert, qualitativ bestimmt. GSH ließ sich mit diesen Methoden von den Aminosäuren Glu, Cys, Gly, β -Ala und ABA sowie von PC abtrennen, nicht jedoch von Glu-Cys.

II.4.9.2 GSH-Bestimmung mit HPLC

Eine quantitative Bestimmung von GSH neben Cys und den PC-Peptiden, jedoch keine Abtrennung des GSH von Glu-Cys, war aus Rohextrakten über die HPLC mit SH-spezifischer Detektion möglich. Von 1 - 100 nmol GSH (Cys: bis 200 nmol) wurde eine lineare Beziehung zwischen "Peak"fläche und eingesetzter Peptidmenge erhalten.

Cystein, die Dipeptide Glu-Cys und Cys-Gly, GSH und hGSH konnten nach Derivatisierung mit Monobrombiman nach Newton et al. (1981) über HPLC voneinander getrennt und quantitativ bestimmt werden. Die Monobrombiman-Derivate des Mercapto-Ethanol und des S^{2-} wurden von den Derivaten von Monothiolen abgetrennt. Aufgrund der nicht vollständigen Derivatisierungsreaktion mit Polythiolen konnten die aus PC-Peptiden erhaltenen Reaktionsprodukte nicht eindeutig zugeordnet werden. Die Detektion erfolgte beim Absorptionsmaximum der Derivate, 368 nm. Die HPLC-Methoden werden gesondert beschrieben (II.4.11)

II.4.9.3 Enzymatische GSH-Bestimmung

Eine spezifische GSH-Bestimmung wurde mit dem ursprünglich von Owens und Belcher (1965) beschriebenen und von Tietze (1969) modifizierten Testsystem durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen zyklisierenden enzymatischen Test nach folgendem Schema (siehe auch Anderson 1985):



Schema der enzymatischen, cyclisierenden GSH-Bestimmung nach Tietze (1969). NADH (Abs. bei 340 nm) wird verbraucht, TNB²⁻ (Abs. bei 410 nm) wird angehäuft. Bei dem pH von 7,5 ist die dissoziierte Form des GSH, GS⁻, an der nicht-enzymatischen Weiterreaktion beteiligt.

Nacheinander wurden folgende Lösungen in Halbmikro-Plastik-einmalküvetten pipettiert:

940 μ l Puffer (110 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5) mit 1 mM DTNB und 3 mM EDTA

20 μ l Glutathionreduktase (SERVA) mit 1 U Aktivität

20 μ l NADPH 10 mM

Der Enzymansatz wurde durch Probenzugabe (1 - 20 μ l mit max. 1 nmol GSH) gestartet, die Absorptionszunahme bei 410 nm wurde gegen eine Vergleichsküvette ohne GSH registriert. (Sinnvolle Schreibereinstellung: 5 cm/min; A_{410} = 0,5 volle Skalenbreite.) Die enzymatische Glutathionbestimmung wurde mit authentischem GSH (0,1 - 10 nmol) als innerem und äußerem Standard kalibriert. Außer GSH gab nur hGSH eine Reaktion (Glutathion-Reduktase reagiert mit hGSH, Carnegie, 1963). Cys, Glu-Cys, Cysteinylglycin und die PC-Peptide ergaben keinen Umsatz. Nach Conn und Vennesland (1951) werden auch Asparthion und Homocystein nicht von Glutathionreduktase umgesetzt.

II.4.10 Bestimmung von PC-Peptiden

Als intakter Komplex oder als freie SH-Peptide konnte PC nicht mittels DC aufgetrennt werden. Nur die perameisensäureoxidierten und mit DNFB derivatisierten PC-Peptide ließen sich in dem für die zweidimensionale DC beschriebenen Laufmittel (II.4.7.3) zu diskreten Bandenmustern auftrennen. Unter diesen Bedingungen wurden GSH, Glu-Cys und die einzelnen Aminosäuren nicht mehr voneinander getrennt. Eine quantitative Bestimmung der PC-Peptide erfolgte über analytische HPLC mit SH-spezifischer Detektion (siehe II.4.11)

II.4.11 HPLC-Methoden

II.4.11.1 Schnellaufschluß-Methode

Nach Grill et al. (1987) und Grill (1987) wurden frisch

geerntete Pflanzensuspensionskulturzellen bzw. mit flüssigem Stickstoff schockgefrorenes und anschließend gemahlenes Gewebe differenzierter Pflanzen (0,4 g) mit 0,4 ml 1 N NaOH, + 1 mg NaBH_4 /ml versetzt. Die Probe wurde ultrabeschallt (Branson Sonifier, Branson USA; 3 x 5 sec. auf Stufe 4, Mikrorüssel) und die Zellbruchstücke abzentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ in ein neues Eppendorfggefäß überführt und mit 100 μl 3,6 N HCl angesäuert. Nach 15 Min. Inkubation im Eisbad wurde ausgefallenes Protein durch erneute Zentrifugation abgetrennt. Zellen von Mikroorganismen wurden in analoger Weise aufgeschlossen, 20 - 200 mg (Naßgewicht) Zellen wurden in 400 μl H_2O suspendiert und durch Zugabe von 100 μl 2,5 N NaOH mit 1 mg/ml NaBH_4 nach Ultrabeschallung lysiert. Die Suspension wurde weiterbehandelt wie oben beschrieben.

II.4.11.2 Analytische HPLC

20 - 250 μl der mit der Schnellaufschlußmethode erhaltenen, weitgehend entproteinisierten und klaren Überstände wurden mit einer automatischen Anlage zur HPLC injiziert. Für die "reversed-phase"-HPLC (Ionenpaarchromatographie R-NH_3^+ /Phosphat der Peptide) kamen Säulen von 4 x 250 mm zum Einsatz, die entweder mit Nucleosil 10 C-18 (Macherey und Nagel, Düren) oder mit Licrosorb RP-18 7μ (Merck, Darmstadt) gefüllt waren. 10 - 1000 μg in H_2O gelösten Phytochelatins wurden injiziert und mit folgendem Gradienten eluiert:

Zeit (min)	%A	%B
0	100	0
2,5	75	25
17,5	0	100
18	0	100
19	100	0
20	100	0

Fluß: 2ml/min, Laufmittel A: 0,05 % H_3PO_4 in H_2O

Laufmittel B: 20 % Acetonitril, 0,05 % H_3PO_4 in H_2O

Zur Analyse gereinigter Präparationen erfolgte die Detektion bei 220 nm, zur Analyse von Rohextrakten wurde SH-spezifische Detektion mit Ellmans Reagens (DTNB) durchgeführt (Grill et al. 1986 b). Eine weitere HPLC-Pumpe mischte dem Eluat der Trennsäule das Reagens (75 μ M DTNB in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8) über ein T-Stück mit 2 ml/Min. Fluß zu. Nach Durchströmen einer Reaktionsschleife von 5 ml Volumen, das entspricht 1,25 min Reaktionszeit, wurde die Absorption bei 410 nm in einem Durchflußspektralphotometer registriert und von einem automatischen Integrationssystem synchron aufgezeichnet und die "Peak"flächen berechnet. Die Reaktion wurde mit GSH kalibriert, die Meßwerte wurden auf nmol Peptid umgerechnet und auf das TG bzw. den Proteingehalt der Probe bezogen.

II.4.11.3 Semipräparative HPLC

Zur semipräparativen HPLC-Auftrennung der Phytochelatin-Peptide mit einer Waters HPLC-Anlage kamen Säulen der Dimensionen 20 x 250 mm und 25 x 250 mm zum Einsatz. Gereinigte Phytochelatin-komplex-Präparationen (bis zu 100 mg pro Injektion) wurden auf pH 1,5 eingestellt und steril filtriert. Laufmittel und stationäre Phasen waren die gleichen wie für analytische HPLC, jedoch wurde statt H_3PO_4 0,1 % der leichter flüchtigen Trifluoressigsäure eingesetzt. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 - 20 % Acetonitril in 20 bzw. 40 min, die Detektion erfolgte bei 220 nm. Die eluierenden Peptide wurden in Fraktionen aufgefangen und im Stickstoffstrom zur Trockene eingengt; bei größeren Volumina gefriergetrocknet. Zur vollständigen Entfernung der Trifluoressigsäure mußte noch mehrmals unter Sauerstoffausschluß in Wasser aufgenommen und erneut eingetrocknet werden.

II.4.11.4 HPLC-Auftrennung von Monobrombimanderivaten

Dazu wurden Monobrombimanderivate der Thiolpeptide wie in

II.4.5.1 beschrieben hergestellt. Die Derivate der Referenzsubstanzen wurden 1 : 10 in 200 mM Na-Citrat-Puffer, pH = 2, verdünnt. Mit dem von Newton et al. (1981) beschriebenen Laufmittel: 2,5 ml/l Eisessig in H₂O, pH = 3,9 mit NaOH eingestellt, 10 % MeOH (auf Nucleosil C-18) oder 15% MeOH (LiChroSorb RP-18) wurden die Derivate von Monothiolen isokratisch getrennt. Nicht umgesetztes Reagens, mit H₂S und Mercapto-Ethanol umgesetztes Reagens und die Reaktionsprodukte mit PC-Peptiden wurden durch einen Gradienten von 15 % MeOH bis 90 % MeOH (im Laufmittel-Puffer) in 20 Minuten aufgetrennt.

II.4.11.5 HPLC mit Szintillationsdetektion von Radioaktivität im Eluat

Radioaktiv markierte Peptide wurden mit analytischer HPLC (II.4.11.2) aufgetrennt. Das Eluat der analytischen HPLC-Säule wurde zur Detektion von Radioaktivität mit Szintillatorflüssigkeit (Rotiszint 22, Roth, Darmstadt) mit einem Fluß von 2 ml/min in einer Mischkammer vermischt und in einem Durchflußszintillationszähler (Berhold, Wildbad) kontinuierlich gezählt. In einem Mikrocomputer wurden die Daten in 2¹⁰ Positionen gespeichert und elektronisch datenverarbeitet.

II.5 Synthese von Substraten

II.5.1 Synthese von γ -Glutamyl- α -Aminobuttersäure (γ Glu-ABA)

Nach der Methode von King und Kidd (1949), abgewandelt von Meister und Orlowski (1971) sowie Anderson und Meister (1985) können γ -Glutamylpeptide elegant synthetisiert werden, indem am N durch Phthalsäure geschütztes und als Anhydrid der beiden Carboxygruppen aktivierte Glutaminsäure mit freien Aminogruppen von Aminosäuren oder Peptiden umgesetzt wird. Die Reaktion zum α -Peptid ist dabei sterisch gehindert. Mit freien SH-Gruppen, z.B. im Cys, werden Thioester gebildet, die sofort hydrolysieren, SH-Gruppen müssen des-

halb geschützt werden. Der einfachste Schutz der SH-Gruppe als Disulfid ist für Cystein in dieser Reaktion nicht praktikabel: mit Cystin ist die Reaktion wegen dessen Unlöslichkeit in 100% Essigsäure nicht durchführbar. Die Reaktion nach King und Kidd (1949) wurde deshalb nur zur Synthese von Glu-ABA eingesetzt.

II.5.1.1 Synthese von N-Phthaloyl-L-Glu-Anhydrid

Es wurde 1/10 Ansatz nach Meister et al. (1981, nach King und Kidd 1949) durchgeführt. 20 g Phthalsäureanhydrid und 20 g L-Glu wurden zu feinem Pulver zerrieben und gründlich gemischt. Die Pulver wurden unter Rühren auf einem Ölbad von 150°C in einem 100 ml-Rundkolben langsam geschmolzen. Der Kolben wurde mit einem Wattestopfen verschlossen, um das Absublimieren des Phthalsäureanhydrids zu verhindern. Nach dem Schmelzen (ca. 30 Min.) wurde der Ansatz noch 10 Min. bei 140°C gehalten, danach in ein Ölbad von 110°C überführt und nach dem Abkühlen (ca. 5 Min. unter Erstarren) mit 25 ml Acetanhydrid gelöst. Die Lösung wurde noch 10 Min. bei 95°C gerührt. Danach wurde in 75 ml Xylol von 60°C eingegossen und der Ansatz rasch unter Vakuum durch eine Glasfritte Nr. 3 abfiltriert (auch Fritte und Saugflasche auf 60°C vorgewärmt). Der Ansatz wurde langsam abgekühlt, die Kristallisation fand über Nacht bei 4°C im Kühlschrank statt. Die Kristalle wurden mit einer Mischung aus 5 ml Acetanhydrid und 15 ml Xylol gewaschen und im Vakuum über P₂O₅ getrocknet. Die Ausbeute betrug 21,88 g, das entspricht 62 %. Der Schmelzpunkt war 195°C (Literatur: Ausbeute 78 % - 85 %, Schmelzpunkt 199°C - 200°C).

II.5.1.2 Synthese von Glu-ABA

5 g N-Phthaloyl-L-Glu-Anhydrid und 2 g ABA (je 0,02 mol) wurden in 20 ml 100% Essigsäure gelöst und 15 Minuten bei 90°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde einrotiert, mit Ethanol wieder aufgelöst und mehrmals wieder

einrotiert bis die Essigsäure völlig abgezogen war. Der Rückstand wurde in 38,5 ml Methanol aufgelöst und mit 0,04 mol Hydrazinhydrat 95%ig (1,28g) und 2 mol Triethylamin (5,55 ml) versetzt. Nach 2 Tagen bei Raumtemperatur wurde das Methanol am Rotationsverdampfer abgezogen und der weiße Rückstand in 80 ml H₂O suspendiert. Mit HCl wurde der pH auf 3 eingestellt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Suspension filtriert, das Filtrat wurde mit 1 n NaOH auf pH 5 eingestellt. Das Rohprodukt wurde durch Ionenauschromatographie an Dowex 1-x4 gereinigt. Das Produkt wurde bei 40°C am Rotaionsverdampfer eingeeengt, der Rückstand in 20 ml Methanol gelöst und das Produkt bei 4°C auskristallisiert. Die Kristalle wurden abgesaugt, mit Ether und dann mit Ethanol gewaschen. Das Produkt (2 g, das entspricht 48% d. Th.) hatte einen Schmelzpunkt von 183 - 185°C. (Literatur: 2,93 g = 70%, Smp. = 184-186 °C).

II.5.1.3 Ionenauschromatographie von γ -Glu-Peptiden und GSH

In einer Modifikation der Methode von Anderson und Meister (1985) wurde Dowex 1-X4 schwach saurer Anionentauscher nach der Herstellervorschrift in die Formiatform überführt, mit H₂O dest. neutral gewaschen und in eine Säule (5 cm x 30 cm) gepackt. Die Auftragslösung wurde auf pH = 7 eingestellt und mit H₂O dest. verdünnt, bis die Leitfähigkeit unter der einer 50 mM NaCl-Vergleichslösung lag. Die Säule wurde mit einem Fluß von 100 ml/h betrieben, nach dem Auftrag wurde mit H₂O dest. nachgewaschen, bis kein Ninhydrin-positives Material mehr eluierte. Danach wurde entweder mit Stufen von 0,15/0,3 N Ameisensäure eluiert, oder es wurde ein Gradient von 0 - 1 N Ameisensäure angewandt. Die Fraktionen wurden durch DC analysiert; Fraktionen, die das erstrebte Peptid enthielten, wurden vereinigt. Letzte Spuren von Verunreinigungen wurden mit der semipräparativen HPLC abgetrennt.

II.5.2. Herstellung von Glu-Cys aus Glutathion

Oxidiertes Glu-Cys wurde durch enzymatischen Abbau aus oxi-

diertem Glutathion hergestellt. Das Enzym Carboxypeptidase A, das mit relativ breiter Substratspezifität carboxyterminale Aminosäuren abspaltet, kann Disulfidbrücken nicht überwinden, spaltet aus oxidiertem Glutathion also nur das terminale Glycin ab (Grassmann et al. 1930, Gutcho und Lauffer 1954, Anderson 1985).

1 g oxidiertes Glutathion wurde in 28 ml H_2O gelöst und mit NH_4OH auf $pH = 8$ eingestellt. 5000 U Carboxypeptidase A (Sigma) und einige Tropfen Toluol zur Verhinderung von Mikroorganismenwuchs wurden hinzugefügt. Der Ansatz wurde 24 h bei $30^\circ C$ im Wasserbadschüttler geschüttelt, dann wurden weitere 500 U Carboxypeptidase A zugefügt und nochmals 16 h inkubiert. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC kontrolliert. Der Ansatz wurde verdünnt und durch Ionenauschromatographie gereinigt wie unter II.5.1.3 beschrieben. Alternativ wurde der Ansatz gefriergetrocknet, in Laufmittel aufgelöst und durch semipräparative HPLC gereinigt. Dadurch konnte Glu-Cys nicht nur von Glycin, sondern auch von noch unumgesetztem Glutathion abtrennt werden. Die Abwesenheit von Glutathion aus dem präparierten Glu-Cys wurde mit Hilfe des enzymatischen Testes (Tietze 1969) nachgewiesen. Um reduziertes Glu-Cys ohne störendes DTE oder Borhydrid zu erhalten, wurde die Reduktion mit DTE (Butler et al. 1976) oder mit $NaOH/NaBH_4$ durchgeführt, sofort angesäuert und frisch durch semipräparative HPLC aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden unter Sauerstoffausschluß zur Trockene eingeengt (im Stickstoffstrom oder durch Gefriertrocknen).

II.5.3. Isolierung von Homoglutathion

GSH wurde nach Hopkins (1929) und Pirie (1930) ursprünglich aus Hefe durch Extraktion mit 0,5 N H_2SO_4 und Benzol und anschließende Fällung mit Hg-, Pb- und Cu-Salzen gewonnen. Wegen der großen Giftigkeit von Quecksilber und Benzol wurde auf die getreue Wiederholung dieser Methoden verzichtet. Die Fällung mit Cu_2O erfordert Vorsicht, da der Komplex in einem Überschuß von Cu^+ sowie bei Anwesenheit von Cl^- Ionen lös-

lich ist (Pirie 1930).

Homoglutathion wurde deshalb über semipräparative HPLC aus Homo-Phytochelatin-Komplexen gewonnen. Größere Mengen Homoglutathion konnten durch Extraktion mit 50 % Ethanol aus 20 Kg Stangenbohnenfrüchten (Gehalt nach enzymatischem Test: 1720 mg Homoglutathion) gewonnen werden. Der Extrakt wurde von den Zelltrümmern durch vier Lagen Windemull abgepreßt, die Trübung abzentrifugiert und der Extrakt auf 1/10 seines ursprünglichen Volumens im Vakuum bei 40 °C eingeengt. Daraus wurden saure Peptide durch Ionentauschchromatographie an Dowex 1 x 4 gewonnen (siehe II.5.1.3) Im Eluat wurde der Gehalt an SH-Gruppen bestimmt, auf 0,5 N H₂SO₄ eingestellt und die Thiole durch Zugabe einer Suspension von 1/2 Äquivalent Cu₂O (rotem Kupferoxid) in Wasser als weißlicher Niederschlag ausgefällt. Der Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen, in einer geringen Menge Wasser resuspendiert und das Kupfer durch einen langsamen Strom von H₂S (frisch hergestellt aus Sulfidogen, Merck) als schwarzer Niederschlag ausgefällt. Überschüssiges H₂S wurde mit N₂ ausgetrieben. Aus dem Rückstand nach Gefriertrocknen konnte das Peptid durch semipräparative HPLC endgereinigt werden.

II.6 Enzymatische Methoden

II.6.1 Enzymaktivitätsbestimmung von GS I und GS II

Modifiziert nach Mooz und Meister (1971) wurden die GSH-Biosyntheseenzyme anhand des aus ATP freigesetzten Phosphats bestimmt.

Für jede Probe wurde in ein Eppendorfgefäß pipettiert:

16 µl Triethanolamin-Puffer 1 M pH 8,4

16 µl ATP 100 mM pH 7

16 µl Rinderserumalbumin 10%

5 µl DTE 100 mM

5 µl Mg Cl₂ 1 M

je 8 µl der als Substrate benötigten Aminosäuren oder Peptide (Glu, Cys, Gly, β-Ala, Glu-Cys oder Glu-ABA), jeweils 100 mM.

Für Reihenuntersuchungen z. B. von Säuleneeluaten wurden entsprechende Vielfache dieser Lösungen gemischt und 66 µl der Mischung in jedes Probengefäß pipettiert. Die für jeden Meßwert getrennt angesetzte Kontrolle enthielt ATP, aber statt der Aminosäuren H_2O . Der Enzymansatz wurde durch Zugabe von 94 µl Enzym gestartet und 1 h bei 30°C (Pflanzenproben) bzw. 37°C (Enzyme aus E. coli) inkubiert, danach wurde durch Zugabe von 40 µl 20% Trichloressigsäure gestoppt.

II.6.1.2 Nachweis des freigesetzten Phosphats

Zum Nachweis anorganischen Phosphats wurde die Methode von Chen et al. (1956) eingesetzt.

Reagenslösung: 1 Teil 10 % Ascorbat

1 Teil 2,5 % Ammoniummolybdat

1 Teil 25 % H_2SO_4

2 Teile H_2O

wurden frisch gemischt und 400 µl Reagens mit 100 µl Probe aus dem Trichloressigsäure-gefällten Enzymansatz versetzt. Nach 30 min. bei 50°C wurde die Absorption bei 570 nm bestimmt. Die Enzymaktivität ließ sich aus der Differenz der Absorption mit Zugabe von Aminosäuren gegen Kontrolle ohne Aminosäuren berechnen.

II.6.2 Isolierung von Enzymen der Glutathionbiosynthese

In Anlehnung an Vorschriften von Mooz und Meister (1971), Orlowski und Meister (1971), Wendel et al. (1975) und Gushima et al. (1983 b) wurden folgende zwei Methoden ausgearbeitet, die durchgängig bei max. 10°C durchgeführt wurden:

II.6.2.1 Isolierung von Glutathionbiosyntheseenzymen aus Pflanzenzellkulturen

Pflanzensuspensionkulturzellen wurden durch Vakuumfiltration geerntet und mit 10 % ihres Gewichtes an Polyvinyl-Poly-Pyrrolidon sowie einem Volumen an Puffer: 100 mM Tris x HCl, pH = 8, 10 mM Diethyl-Dithiocarbamat, 10 % Glycerin, je 1 mM Cys, Glu, Gly und $MgCl_2$ versetzt und im 5l Waring Blendor

Cys, Glu, Gly und $MgCl_2$ versetzt und im 5l Waring Blendor (Waring corp., USA) 4 x 10 sec. homogenisiert. Das Homogenat wurde durch 4 Lagen Windelmull abgepresst, der Rückstand wurde erneut mit 1/2 Volumen Puffer A homogenisiert und erneut filtriert. Die vereinigten Filtrate wurden zentrifugiert und aus dem unbedingt klaren Überstand durch Ammoniumsulfatfällung (30%/60% Sättigung) eine vorgereinigte Enzympräparation erhalten. Die Präparation wurde gegen den Aufschlußpuffer, jedoch ohne Aminosäuren, über Nacht dialysiert. Das Retentat der Dialyse der 60 % Ammoniumsulfatfällung wurde mit 10 mM Tris x HCl, pH = 7; 5 % Glycerin auf das dreifache Volumen verdünnt und auf eine Säule (1,7 x 25 cm) mit QAE-Sepharose FF (Pharmacia), die im selben Puffer äquilibriert war, mit 60 ml/h aufgetragen. Es wurde mit Startpuffer nachgewaschen; sobald das Eluat proteinfrei war, wurde ein Gradient von 0 - 0,5 M NaCl im Startpuffer zur Elution gebundener Proteine angelegt.

Fraktionen von 4 ml wurden aufgefangen und die Absorption bei 280 nm kontinuierlich registriert. Jede zweite Fraktion wurde auf unspezifische ATPase und Glutathionbiosynthese-Aktivitäten getestet. Die Fraktionen mit der jeweils höchsten Aktivität an den zwei Glutathionbiosyntheseenzymen wurden vereinigt. Die Fraktionen wurden durch Ultrafiltration in einer Amiconzelle (Amicon, Düren) an einer PM 10-Membran in 10 mM MES, pH = 6 umgepuffert und auf ein geringes Volumen eingengt.

Je 2 ml dieser Fraktionen wurden mit HPLC-Gelfiltration weitergereinigt. Die Säule war in 10 mM MES, pH = 6,0, 25 mM NaCl äquilibriert. Die Säule wurde mit einem Fluß von 90 ml/h betrieben, es wurden Fraktionen von je 1,5 ml gesammelt und die Absorption bei 280 nm kontinuierlich registriert. Wieder wurden die Fraktionen auf Enzymaktivität untersucht, die aktiven Fraktionen wurden vereinigt. Die Fraktionen wurden durch Ultrafiltration an der PM 10 Membran auf den Startpuffer für die FPLC umgepuffert: 10 mM Tris x HCl, pH = 8,5. 2 ml des Retentats aus der Gelfiltration mit

10 mg Protein in 10 mM Tris x HCl, pH = 7 wurden auf eine in diesem Puffer äquilibriumierte Mono Q-FPLC Säule (Pharmacia) aufgetragen. Mit einem linearen Gradienten von 0 - 450 mM NaCl, zur Spülung bis 900 mM NaCl im Startpuffer wurden gebundene Proteine eluiert. Fluß: 1 ml/min, Gradient: 5 mM/min, Fraktionen von 1,5 ml wurden gesammelt und die Absorption bei 280 nm kontinuierlich registriert. Die Fraktionen wurden wieder auf Enzymaktivität getestet und aktive Fraktionen vereinigt. Die Proben wurden im Puffer (10 mM Tris x HCl, pH = 7, 5 % Glycerin) oder in 60% Sättigung an Ammoniumsulfat in diesem Puffer bei 4°C aufbewahrt.

II.6.2.2 Anreicherung von GS I und GS II aus E. coli

Zellen von E.Coli Stamm C600 mit pGS 500 aus 20 l Kultur (HD-Medium + 20 µM Chloramphenicol) wurden durch Zentrifugation geerntet. Ca. 60 g Zellpaste wurde mit dem gleichen Volumen an Puffer A: 50 mM Tris x HCl, pH = 8, je 1 mM Cys, Glu, Gly, und 1 mM MgCl₂ versetzt und 20 min im Glasperlenhomogenisator (Vibrogen, Bachofer, Reutlingen) aufgeschlagen. Die Glasperlen wurden über Vakuumfiltration an einer Glasfritte abgesaugt und mit 10 Volumen Puffer A + 5 % Glycerin nachgespült. Die vereinigten Filtrate wurden zentrifugiert (27000 g, 10 min) und zweimal Ammoniumsulfatgefällt: 1. 30%/70% Sättigung; 2. 35%/60% Sättigung. Der jeweilige Niederschlag wurde in einer minimalen Menge Puffer A aufgenommen und über Nacht gegen 10 mM Tris x HCl, pH = 8; je 1 mM Aminosäuren; 5 % Glycerin dialysiert. Diese Rohpräparation wurde auf eine in 10 mM Tris x HCl, pH = 7,5 äquilibriumierte Säule (2,4 x 28 cm) QAE-Sepharose FF (Pharmacia, Freiburg) aufgetragen, mit 2 Säulenvolumina Startpuffer nachgewaschen und mit 0 - 0,5 M NaCl in Startpuffer eluiert. Die Fraktionen (6ml) wurden auf Enzymaktivität untersucht, die Fraktionen mit überwiegend GSI bzw. GSII wurden vereinigt und mit 60% Sättigung an Ammoniumsulfat gefällt. Die Niederschläge wurden in Startpuffer mit je 1 mM Glu, Gly und Cys in 60% Sättigung an Ammoniumsulfat bei 4°C aufbewahrt.

II.6.3 Immobilisierung von Enzymproteinen

Für die Immobilisierung von Enzymen nach der Methode von Weetall (1976) wurde ein anorganischer Träger - poröse Glaskugeln von 0,2 mm $\varnothing$ - mit einem bifunktionellen Silan mit Aminopropylgruppen derivatisiert, an die über Glutardialdehyd als Quervernetzer Proteine ebenfalls über freie Aminogruppen kovalent gebunden werden können.

II.6.3.1 Silanisierung von Glaskugeln

1 g "controlled-pore" Glaskugeln (CPG-10, SERVA, Heidelberg) wurde in 18 ml H_2O suspendiert und 2 ml Aminopropyltriethoxysilan (10 % v/v) (Sigma) zugefügt. Der pH wurde mit 6N HCl auf 3 - 4 eingestellt und der Ansatz 2 h bei 75 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Glasperlern abfiltriert, mit Wasser gewaschen und bei 115 °C über 4 h getrocknet.

II.6.3.2 Kopplung mit Proteinen

1 g Alkylaminglas wurde mit 25 ml Glutaraldehyd (2,5 % in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0) 1 - 2 h bei Raumtemperatur unter ständiger Suspension durch einen Rotationsmischer inkubiert (Verfärbung zu rot-braunen Tönen). Dann wurde das Glas von Glutaraldehyd völlig frei gewaschen und Enzymprotein in mehr als 1 %iger Lösung (50 - 100 mg Protein/g Glas) in 20 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 zugegeben. Der Ansatz wurde bei 4°C mit dem Rotationsmischer über Nacht bewegt und danach mit H_2O vom Überstand freigewaschen. Die Effizienz der Immobilisierung wurde durch Protein- und Aktivitätsmessung im Überstand im Vergleich zum Einsatz bestimmt. Nach dem Auswaschen unspezifisch gebundener Proteine und dem Blockieren unbesetzt gebliebener Aminogruppen in 0,5 M NaCl in 0,5 M Tris x HCl pH 8, 4 h bei Raumtemperatur wurden die immobilisierten Enzyme in Triethanolamin-Puffer mit 1 mM Substraten bei 4°C aufbewahrt.

II.6.4 Enzymatische Synthese unterschiedlich und spezifisch radioaktiv markierter Peptide

Radioaktiv markierte Peptide - mit ^{14}C Glu, ^3H Glu, ^{35}S Cys und ^{14}C Gly, einzeln oder in Kombinationen - wurden enzymatisch hergestellt. Dazu wurden entweder wie oben beschrieben immobilisierte Enzyme, oder die 60%-Ammonsulfatfällung aus E. coli eingesetzt. Die Ammoniumsulfat-gefällte Enzympräparation wurde frisch in Triethanolamin-Puffer pH 8 aufgelöst, mit 1 mM DTE versetzt, 5 min. inkubiert und dann über Miniatursäulen (in Eppendorf-Pipettenspitzen) an Sephadex G-25 entsalzt. Die Enzympräparationen wurden auf diese Weise von Kontaminationen durch mitgeschlepptes GSH und durch zugesetzte bzw. durch Proteaseabbau entstandene freie Aminosäuren gereinigt. Die Enzympräparationen wurden frisch in Standardansätze zur Synthese eingesetzt.

Die Enzymansätze enthielten (Endkonzentration):

100 mM Triethanolaminpuffer, pH = 8

1 mg/ml Rinderserumalbumin

20 mM ATP

3 mM DTE

15 mM MgCl_2

0,5 mM EDTA

je 5 mM der unmarkierten Aminosäuren in 160 μl .

Die markierte Aminosäure wurde in 2,5 mM Konzentration eingesetzt, die spezifische Aktivität wurde der des Gly (113 mCi/mmol, entsprechend 50 μCi /Ansatz) angeglichen. Von ^3H Glu (48 Ci/mmol) und ^{35}S Cys (1115 Ci/mmol) sowie ^{14}C Glu (340 mCi/mmol) wurden die benötigten Mengen an Radioaktivität mit unmarkierter Aminosäure bis zu einer Menge von 400 nmol versetzt. Die Ansätze wurden 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert, danach wurde durch Hitzedenaturierung (5 min im kochenden Wasserbad) oder mit 40 μl Trichloressigsäure die Reaktion gestoppt. Der Verlauf der Reaktion wurde mittels DC verfolgt.

II.6.5 Reinigung radioaktiv markierter Peptide

Zur Reinigung der synthetisierten Peptide über die analytische HPLC wurden die Proben frisch mit NaBH_4 in alkalischer Lösung reduziert, auf $\text{pH} = 2$ angesäuert und in Portionen entsprechend 150 nmol Peptid mit dem analytischen HPLC-System aufgetrennt. Die Detektion erfolgte bei 220 nm, Fraktionen von 700 μl wurden aufgefangen. Von je 10 μl dieser Fraktionen wurde die Radioaktivität bestimmt. Radioaktive Fraktionen, die bei der Retentionszeit des GSH eluierten, wurden vereinigt, mit Tris-Base auf $\text{pH} = 7$ eingestellt, mit Quarzdestilliertem H_2O auf 6 ml aufgefüllt, gleichmäßig auf 6 Eppendorf-Gefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt und erst kurz vor Gebrauch in H_2O aufgenommen.

In den mit HPLC gereinigten Fraktionen wurde GSH enzymatisch bestimmt (Tietze 1969). Die enzymatisch gebildeten Glu-Cys-Peptide zeigten dabei keine Reaktion. Um auch diese Proben mit der hochspezifischen und empfindlichen enzymatischen Bestimmungsmethode verfolgen zu können, wurden je 10 μl dieser Proben erneut zu einem Standard-Enzymsatz ohne Glu und Cys, aber mit Gly gegeben und erneut inkubiert. Nach 2-stündiger Inkubation wurden die Proben hitzedenaturiert, der Überstand wiederum enzymatisch auf GSH getestet und die erhaltenen Werte nach Korrektur für die Verdünnungsfaktoren auf die eingesetzte Aminosäure bezogen. Zur Kontrolle des Einbaus der radioaktiv markierten Aminosäuren wurden Proben der HPLC-Fractionen bzw. der fertig inkubierten Enzymsätze entsprechend 100 nCi mit 10 nmolen der Aminosäuren und GSH versetzt und perameisensäureoxidiert. Die im Eppendorfgefäß gefriergetrockneten Produkte wurden in 10 μl 50 % Ethanol aufgenommen und durch DC getrennt. Die Radioaktivität entlang der im Abstand von 1 cm aufgetragenen 1 cm breiten Bahnen wurde mit einem Dünnschicht-Scanner der Firma Berthold (Wildbad) gemessen. Die Radioprofile wurden mit dem Färbeergebnis nach Besprühen mit Ninhydrin-Reagens verglichen. Die Maxima der Radioaktivität konnten den Aminosäuren

und Peptiden zugeordnet und über ihre Flächen die Umsatzraten bestimmt werden. Alternativ wurde der radioaktive Umsatz auch durch HPLC mit nachfolgender Szintillationsdetektion ermittelt. Dabei wurden Einbauraten mit Glycin zwischen 80% und 100%, mit Glutamat von 60% bis 80% und mit Cystein zwischen 50 % und 60% erzielt. Die Einbauraten in Glu-Cys waren generell etwas schlechter als die in GSH.

II.7. Biologische Methoden

II.7.1. Isolierung von Vesikeln aus Suspensionskulturen von R. serpentina

Nach einer Vorschrift von Depta und Robinson (1986) für die Isolation von "coated vesicles" aus Karottensuspensionskultur wurden Suspensionskulturen von R.serpentina aufgearbeitet.

Puffer A: 100 mM Mercapto-Ethanol, pH = 6,4

0,5 mM $MgCl_2$

1 mM EGTA

3 mM NaN_3

1 mM DTE

0,005 % Phenylmethyl-Sulfonylfluorid (aus 50 mg/ml methanolischer Lösung, bei Aufschluß zugeben)

Puffer B: wie Puffer A, jedoch ohne DTE und Phenylmethyl-Sulfonylfluorid. Dieser Puffer wurde als 2 fach konzentrierte Lösung hergestellt und bei Bedarf verdünnt.

RNAse A: 3 mg/ml RNAse A (Sigma) in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH = 6,5 / 10 mM $MgCl_2$

Belastete (1 - 3 Tage mit 1 mM Pb^{2+}) oder unbelastete Suspensionskulturzellen von R. serpentina (200 - 400 g FG) wurden mit einem Volumen Puffer A und 10 % ihres Gewichtes an Quarzsand (gewaschen und geglüht) versetzt und portionsweise in einem eisgekühlten Mörser homogenisiert (ca. 15 min). Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Das Homogenat wurde 10 min bei 27000 g zentrifugiert, der erhaltene Rückstand wurde erneut mit einem halben Volumen an Puffer A 15 min gemörsert und wieder zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und im Rotor SW 25.2 (Beckman) bei 105000 g 1 h die Vesikel abzentrifugiert. Die Präzipitate wurden in 10 ml Puffer B mit einem feinen Haarpinsel resuspendiert. Der Proteingehalt wurde bestimmt und RNase A bis zu einer Konzentration von 80 µg/mg Protein hinzugefügt. Danach wurde 45 min bei 30°C und 100 rpm in einem Wasserbadschüttler geschüttelt; danach wurde mit Puffer B auf 30 ml verdünnt und 10 min bei 5000 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde auf einen 3-stufigen Saccharosegradienten aufgetragen. Dieser bestand aus 6 ml 50 %; 10 ml 40 % und 12 ml 10 % Saccharose in Puffer B. Die Gradienten wurden im Rotor SW 25.2 1 h bei 105000 g zentrifugiert. Die Bande am unteren Bereich der 40 %igen Stufe wurde gezapft, mit Puffer B auf das 10 fache Volumen verdünnt und zentrifugiert (Rotor 70 Ti, 170000g, P 170 K, Ü 170 K). Das Präzipitat wurde in 2 ml Puffer B resuspendiert (feiner Haarpinsel) und auf einen Ficoll/D₂O-Gradienten aufgetragen. Dieser wurde aus 20 ml leichter Lösung: 10 ml Puffer B 2 x, 1,68 ml D₂O (1800 mg), 600 mg Ficoll 40 und 1,4 ml 1M NaCl; und 20 ml schwerer Lösung: 16,8 ml D₂O (18 g), 1,4 ml NaCl 1 M, 1 ml Puffer B 2 x und 6 g Ficoll 40 (diese Mischung ergibt insgesamt 22,5 ml) durch Mischen in einem Gradientenmischer unter Verwendung einer peristaltischen Pumpe hergestellt. Die fertigen Gradienten wurden 14 h bei 80000 g im Rotor SW 25.2 zentrifugiert, dabei wurde das Material in 2 Banden im mittleren Bereich des Gradienten aufgetrennt. Diese wurden getrennt gezapft, wiederum 10-fach mit Puffer B verdünnt und bei 300000 g 1 h lang abzentrifugiert.

II.7.2 Organellenisolierung aus Suspensionskulturen

Die Isolation von Organellen aus Pflanzensuspensionkulturen wurde nach Vorschriften von Schindler und Soll (1986) sowie Schwitzguebel und Siegenthaler (1984) und Day et al.

(1985) durchgeführt. Die Methoden wurden zur Isolation von Plastiden, Mitochondrien und Peroxisomen aus einem Zellaufschluß einander angeglichen und modifiziert.

Puffer A: 50 mM MOPS (pH = 7,6 mit KOH eingestellt)

330 mM Sorbit (60 g/l)

0,4 mM $MgCl_2$

1 mM EDTA

0,1 % Rinderserumalbumin

Waschpuffer: 330 mM Sorbit, pH = 7,6 mit 1 M Tris Base eingestellt

Zellsuspensionskulturen von R. serpentina oder Dioscorea composita wurden 2 Tage nach dem Animpfen für 2 weitere Tage mit 1 mM Pb^{2+} belastet. Die Zellen wurden durch Vakuumfiltration geerntet (in der Regel 400 g FG aus 4 - 5 Fernbachkolben) und gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen. Für die Organellenisolation wurde grundsätzlich nur frisch doppelt quartzdestilliertes Wasser verwendet. Die Zellen wurden mit 10 % ihres Gewichtes an Polyvinyl-Poly-Pyrrolidon versetzt und mit 1 - 1,5 Volumen Puffer A zu einem Brei verrührt. Außerdem wurden 6 g Sorbit pro kg Zellen zugesetzt, um ein zu starkes Absinken der Osmolarität durch freigesetzten Vakuoleninhalt zu vermeiden (aus den Zellen wurden normalerweise 10 % ihres Gewichts an Extraktvolumen freigesetzt). Der Brei wurde portionsweise in einem Messerhomogenisator (Kamangara et al. 1977) 5 x 2 sec. homogenisiert. Das Homogenat wurde 1. durch 4 Lagen Windelmull und 2. durch Nylongaze mit 30 μm Maschenweite filtriert. Der Rückstand wurde erneut mit 1/2 Volumen Puffer A versetzt, homogenisiert und erneut filtriert. Die Filtrate wurden vereinigt und differentiell zentrifugiert:

1. 10 min 1000 g (Niederschlag verwerfen).

2. 10 min 6000 g (Plastiden-Rohfraktion)

3. 10 min 20000 g (enthält Mitochondrien und Peroxisomen).

Die Niederschläge wurden in dem restlichen, in den Zentrifugegefäßen am Boden zusammenlaufenden Medium vorsichtig mit

einem feinen Haarpinsel suspendiert, um dann mit Puffer A auf ein geringes Volumen (20 ml maximal) aufgefüllt zu werden. Die Suspensionen wurden auf adäquate Gradienten aufgetragen. Für Plastiden: 10 ml 80 % Percoll in Puffer A wurden mit 15 ml 30 % Percoll in Puffer A überschichtet und 50 Min bei 10000 g zur Gradientenformung vorzentrifugiert. Es wurden Polycarbonatröhrchen mit Schraubdeckelverschluß und ein Vertikalrotor (Kontron) verwendet. Die Suspension wurde auf 5 gleiche Gradienten verteilt, ein sechster Gradient erhielt einen Auftrag gleichen Volumens, ohne Organellen, jedoch mit "density marker beads" (Pharmacia). Nach 15 min Zentrifugation bei 6500 g wurden die Gradienten fotografiert und die Bande an der Grenze zwischen 30 % und 80% Percoll gezapft. Die Suspension wurde 10-fach mit Waschlösung verdünnt und abzentrifugiert (6000 g, 15 min). Der Niederschlag (gereinigte Plastiden) wurde in 1 ml Waschpuffer resuspendiert. Die Bande mit aufgeschlagenen Membranbruchstücken im oberen Drittel des Gradienten wurde ebenfalls gezapft und bei 48000 g, 15 min abzentrifugiert.

Die Suspension der Mitochondrien wurde auf 4 gleiche Gradienten, die durch Mischen mit einem Gradientenmischer vorgeformt worden waren, aufgetragen. Zur Herstellung der Gradienten diente als schwere Lösung: 28 % Percoll, 10 % Polyvinylpyrrolidon-25 (Serva) in Puffer A; als leichte Lösung: 28% Percoll in Puffer A. Je 18 ml dieser Lösungen wurden für einen Zentrifugenbecher für den Rotor SS-34 (Sorvall) gebraucht. Nach dem Auftrag der Organellensuspension wurden diese Gradienten 45 min bei 40000 g zentrifugiert, fotografiert und die einzelnen Banden gezapft. Es handelte sich dabei um: Membranbruchstücke (oberes Fünftel des Gradienten), intakte Mitochondrien (ein bis mehrere Banden, zweites Fünftel des Gradienten), und Peroxisomen im unteren Fünftel des Gradienten. Die Peroxisomen wurden bei 10000 g, die Mitochondrien bei 20000 g für 15 min aus einer 10-fach mit Waschlösung verdünnten Suspension abzentrifugiert. Die Niederschläge wurden vorsichtig in je 1 ml Waschlösung resus-

pendiert. Die Fraktionen dieser Aufarbeitung wurden auf ihren Blei-, Protein- und PC-Gehalt untersucht. Weitere Proben wurden für die Elektronenmikroskopie fixiert.

II.7.3 Fixierung von Proben für die Elektronenmikroskopie

Die Ultrastrukturanalyse wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. G. Wanner, Bot. Inst. der Univ. München durchgeführt. Die Ultradünnschnitte und daraus die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Dr. G. Wanner hergestellt. Es wurde ein Siemens Elmiskop 101 verwendet.

Zur Fixierung für die Elektronenmikroskopie wurden die Organellen- oder Vesikelpollen abzentrifugiert und die Niederschläge mit Fixierpuffer überschichtet. Dieser setzte sich aus Cacodylatpuffer (Dimethylarsinsäure, Merck) von derselben Osmolarität und vom selben pH wie der Waschpuffer für die Organellen, 2 mM $MgCl_2$ und 10 vol% Glutardialdehydlösung (25 %, Sigma) zusammen. Nach 1 - 2 stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Niederschläge mit mehreren Pufferwechseln ohne Glutardialdehyd und jeweils 20 minütiger Inkubation sorgfältig gewaschen. In diesem Zustand konnten die Proben über Nacht bei 4°C aufbewahrt werden.

Zur Hauptfixierung wurden die Proben mit Fixierlösung: 1 Teil 4 % OsO_4 (Science Services, München) + 1 Teil Fixierpuffer überschichtet und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben 1 mal mit Fixierpuffer und 1 mal mit H_2O gewaschen. (Dies wurde im Abzug durchgeführt, denn OsO_4 ist sehr toxisch). Danach wurden die Proben in Aceton entwässert. Dazu wurden die Niederschläge jeweils 5 min inkubiert in: 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 60 %, 80 % und 100 % Aceton. Die 40 % Acetonlösung enthielt zusätzlich 1 % Uranylacetat. Nach der letzten Stufe wurde das Aceton noch 2 mal gewechselt und je 10 min inkubiert, um danach mit "Spurr" (Monomergemisch zur Einbettung, Spurr 1969) infiltriert zu werden. Dazu wurde die Probe in 100 µl Aceton

aufgenommen und mit 100 μ l "Spurr"-Monomergemisch (Science Services, München) versetzt. Nach 30 min wurde noch einmal dieselbe Menge (100 μ l) Monomergemisch zugefügt und wieder 30 min inkubiert. Danach wurde der Überstand gegen 100 % Spurr ausgetauscht. Die Proben wurden in 500 μ l fassende, unten spitz zulaufende Plastikgefäße überführt und für 16 h bei 70°C polymerisiert. Zur Kennzeichnung der Proben wurden kleine, tuschebeschriftete Pergamentpapierschildchen mit einpolymerisiert.

II.7.4 Zellkultur-Reihenversuche

Zellkultur-Reihenversuche wurden durchgeführt, indem die zur Verfügung stehende Pflanzensuspensionskultur in einem Kolben vereinigt und homogen geschüttelt wurde, aus diesem Kolben wurden dann je 30 g Kultur in 100 ml-Erlenmeyer-Kölbchen eingewogen und die für 30 ml Kultur berechneten Zugaben zugefügt. Bei Zugabe von SH-Peptiden wurden die Kulturen zusätzlich mit 100 μ M DTE versetzt. Zur Ernte der Kulturen wurde der Inhalt jedes Kolbens in einem Büchner-Trichter mit Nylonnetz (30 μ m Maschenweite) durch Vakuumfiltration trockengesaugt und mit H₂O nachgespült. Eventuell an die Zellwände oxidativ gebundene Thiole wurden durch eine Nachspülung mit 100 μ M DTE abgelöst. Die geernteten Zellen wurden in vorher ausgewogene Petrischalen ($\varnothing$ 4,5 cm) überführt, je 400 mg für die HPLC-Bestimmung abgenommen und die Schälchen erneut gewogen. Nach 2 Tagen bei 60°C im Vakuum-Trockenschrank (Heraeus, Hanau) wurde das Trockengewicht bestimmt. Dabei wurden generell Doppelbestimmungen durchgeführt.

Fütterungen radioaktiv markierter Substrate wurden, um besonders hohe Radioaktivität pro Zelle einsetzen zu können, auch in 1,5 ml Suspensionskultur-Proben in Szintillationsgläschen durchgeführt. Diese Gläschen ($\varnothing$ 1,8 cm) wurden in einem Wasserbadschüttler bei 25°C und 150 U/min inkubiert. Zur Verfolgung der Aufnahme der Radioaktivität wurden in gewissen Zeitabständen Proben von 20 μ l entnommen und im

Szintillationszähler gezählt. Die Zellen konnten gewaschen und geerntet werden, indem das Medium mit einer Druckpipette abgesaugt wurde. Die Zellen wurden dabei nicht durch die enge Öffnung der Plastik-Pipettenspitze gesaugt, sondern bildeten ein "Sieb", durch das die Kultur trockengesaugt werden konnte. Zur Entnahme wurde eine Pipettenspitze mit vergrößerter Öffnung verwendet.

II.8. Isolierung von PC-Komplexen aus Pflanzen

II.8.1. Isolierung von PC aus R. serpentina

Diese Methode wurde von E. Grill (1987) ausgearbeitet und konnte übernommen werden. Das aufzuschließende Gewebe (200 - 500 g FG) wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, mit der gleichen Gewichtsmenge an Puffer: 10 mM Mercapto-Ethanol, 10 mM Tris x HCL pH = 8,6, versetzt und in einem 5l-Waring-Blender 4 x 20 sec homogenisiert. Alle weiteren Aufarbeitungsschritte erfolgten bei 4°C. Das Homogenat wurde durch 4 Lagen Mull gepresst und der Extrakt 10 min bei 27000 g zentrifugiert. Zur Isolierung von PC aus Mikroorganismen (Pilze, Algen) wurden die belasteten Zellen durch Zentrifugation geerntet und die Zellpaste mit der Hälfte ihres Volumens an 100 mM Tris x HCl pH = 8 versetzt. In diese Suspension wurden Glasperlen ($\varnothing = 0,18$ mm) eingetragen, bis ein sehr fester Brei entstand. Stahlbecher passender Größe wurden mit dieser Paste randvoll gefüllt, fest verschlossen und in einer wassergekühlten Zelmühle (Vibrogen, Bachofer, Reutlingen) innerhalb 30 Min. die Zellen vollständig aufgebrochen (Mikroskopkontrolle). Die Glaskügelchenpaste wurde über eine Glasfritte No. 3 (Schott, Mainz) abgesaugt und mit 10 mM Tris x HCl, pH = 8 nachgewaschen. Der Rohextrakt wurde wie oben beschrieben zentrifugiert.

Der Rohextrakt wurde mit 1 N NaOH auf pH 8,6 nachgestellt und mit H₂O verdünnt, bis die Leitfähigkeit unter 1 mSi

(50mM NaCl - Vergleichslösung) lag (Leitfähigkeitsmeßzelle der WTW, Weilheim). Diese Lösung wurde auf eine DEAE-Biogel (BioRad, München) Säule der Dimension 2,5 x 25 cm aufgetragen. Das Säulenmaterial war in 10 mM Tris x HCl pH 8,6 äquilibriert worden. Größere Mengen Rohextrakt (aus bis zu 3 kg Pflanzenmaterial) wurden über eine DEAE-Biogelsäule von 7,5 x 20 cm chromatographiert. Der lineare Fluß betrug 0,5 cm/min. Die Säule wurde mit 2 Säulenvolumen Startpuffer nachgewaschen, danach wurde gebundenes Material mit Startpuffer + 0,5 M NaCl eluiert. Proteinhaltige, aus Pflanzenmaterial schon mit bloßem Auge an ihrer braunen Färbung erkennbare Fraktionen wurden gesammelt. Das Eluat der DEAE-Säule wurde mit festem Ammoniumsulfat unter Rühren langsam versetzt, bis 85 % Sättigung erreicht waren (0,6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{ml}$). Nach 1 h Inkubation auf dem Eisbad wurden ausgefallene Proteine durch Zentrifugation 27000 g, 15 min. entfernt. Dieser Überstand wurde in eine Druck-Ultrafiltrationszelle (Amicon, Düren) filtriert und über eine Membran YM 2 entsalzt. Durch mehrmaliges Einengen auf ein geringes Volumen und Verdünnen mit Puffer wurde das Ammoniumsulfat und andere niedermolekulare Substanzen ausgewaschen und das Retentat auf 4 - 6 ml eingengt.

Aus diesem Retentat wurden letzte Reste an Protein und Salz durch Gelpermeationschromatographie an Sephadex G-50 (Trennbereich: 1,5 - 30 kDa) abgetrennt. Die Säule (2,5 x 60 cm) war in 5 mM Ammoniumacetatpuffer pH 7,5 äquilibriert und erlaubte einen Auftrag von maximal 10 ml Volumen. Die Säule wurde mit einem Fluß von 90 ml/h eluiert, Fraktionen von 6 ml, das entspricht 4 Minuten, wurden aufgefangen und der Gehalt an Cadmium und SH-Gruppen bestimmt. Die Absorption der Cd-Thiolatkomplexe bei 254 nm wurde kontinuierlich registriert (Rinderserumalbumin hat bei 280 nm eine Absorption von 0,76/mg x ml; bei 254 nm eine Absorption von 0,33/mg x ml, Proteine werden somit bei dieser Wellenlänge mit geringerer Empfindlichkeit erfaßt). Die in allen drei Parametern positiven Fraktionen, die gut vom vorausgehenden

Protein und dem mit dem Gesamtvolumen eluierenden Salz abgetrennt waren, wurden vereinigt und gefriergetrocknet. Wenn die nach dem Gefrieretrocknen verbleibenden Reste des Puffersalzes (Ammoniumacetat) entfernt werden sollten, wurde die Probe durch Chromatographie an Sephadex G-10 in H_2O völlig entsalzt.

II.8.2 Modifizierte Methode zur Isolierung von Homo-Phytochelatininkomplexen

Mit Cd^{2+} belastete Zellsuspensionkulturen von Mungobohne und Sojabohne sowie von Robinia pseudacacia zeigten hauptsächlich Synthese von hPC 2 und hPC 3, nur sehr wenig der höheren Homologen. Außerdem war die Ausbeute an hPC, bezogen auf Protein wesentlich geringer als für PC aus Rauwolfia serpentina. Bei der Ultrafiltration traten große Verluste an hGSH und hPC2 ein. Deswegen mußte der effektivste Reinigungsschritt, die Ammoniumsulfatfällung, wegen der danach nötigen Ultrafiltration umgangen werden.

Das analog zum Verfahren für PC-Komplexe erhaltene Eluat der DEAE-Säule wurde innerhalb von 30 min mit dem gleichen Volumen an EtOH unter Rühren versetzt und noch 1/2 h auf Eis inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation (27000 g, 10 min) entfernt und der Überstand im Vakuum bei 40°C zur Trockene eingedunstet. Der Rückstand wurde in 10 ml Ammoniumacetatpuffer pH 8 für die Gelchromatographie aufgenommen, dabei unlöslich gebliebenes Material wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf Sephadex G-50 chromatographiert. Das Cd- und SH- positive Material eluierte in einem sehr breiten Peak, der zum Teil mit den Salzfraktionen überlappte (M_r etwa 2000 Da). Das Produkt wurde deshalb nach Gefrieretrocknen erneut in Laufpuffer aufgenommen und über Sephadex G-10 erneut chromatographiert, um das Salz völlig abzutrennen. Wieder wurden Cd- und SH- positive Fraktionen vereinigt und das Produkt gefriergetrocknet.

II.8.3. Herstellung metallfreier PC-Peptide

Um metallfreien Liganden (PC-Peptide in nativer Mischung) zu erhalten, wurde PC-Komplex zu einer 10 %igen Lösung in H_2O aufgenommen, und mit HCl auf pH 1 angesäuert. Diese Lösung wurde mit einem langsamen Strom von aus Sulfidogen (Merck) frisch hergestelltem H_2S durchperlt, bis kein weiteres, gelbes CdS mehr ausfiel. Die Abwesenheit von Cd im Überstand wurde mit AAS nachgewiesen. Restliches H_2S wurde aus der Lösung mit Stickstoff ausgetrieben, die Lösung unter Stickstoffatmosphäre eingefroren und gefriergetrocknet. Mehrmalige Wiederholung des Gefrier Trocknens entfernte den Hauptteil des HCl , danach wurde das Peptid in einem kleinen Volumen H_2O aufgenommen, der pH mit $NaOH$ auf 7,0 eingestellt und die Lösung unter Stickstoffatmosphäre eingefroren aufbewahrt.

Der Gehalt an Phytochelatinpeptiden wurde mittels HPLC bestimmt. Die Peptide konnten durch Chromatographie an Sephadex G-10 in N_2 -gesättigtem H_2O salzfrei erhalten werden.

II.8.4 Rekonstitution von PC-Komplexen

PC-Ligandengemisch wurde nach einer von J. Thumann ausgearbeiteten Methode mit Zn^{2+} rekonstituiert.

Das gefriergetrocknete, noch salzsaure (pH 2) Ligandengemisch (II.8.3) wurde in einer geringen Menge H_2O zu einer 10 %igen Lösung aufgenommen. Der Gehalt an SH-Gruppen wurde bestimmt und eine äquimolare Menge $ZnCl_2$ in saurer Lösung hinzugefügt. Danach wurde der pH mit 1 N $NaOH$ langsam auf 7 eingestellt. Dabei zwischenzeitlich ausgefallenes Peptidmaterial löste sich bei neutralem pH wieder auf. Die so erhaltene Lösung wurde durch Chromatographie an Sephadex G-10 in stickstoffgesättigtem Wasser entsalzt. Dabei eluierten ca. 25 % des zugesetzten Zn^{2+} mit dem Gesamtvolumen, also als "freies" Zn^{2+} .

II.9 Ganzkörperretentionsmessungen

Alle Arbeiten mit ^{109}Cd wurden im Institut für Nuklearbiologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg, in Zusammenarbeit mit den Herren Dr. W. E. Kollmer und Dr. D. Berg durchgeführt. Die Durchführung der Experimente zu stoffwechselphysiologischen Untersuchungen mit ^{109}Cd ist zum besseren Verständnis der Ergebnisse mit diesen zusammen in Kap. III.5 beschrieben.

III. Ergebnisse

III.1 Phytochelatin-Synthese in Angehörigen der Spermatophyta

Die von Grill et al (1985 a) aus Suspensionskulturen von R. serpentina sowie einiger anderer Pflanzen isolierten und charakterisierten Phytochelatine (PC) sind eine homologe Reihe von Peptiden der Struktur $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n = 2 - 11$). Die PC- Cd^{2+} -Komplexe weisen 30 mol% Cys, einen Cd-Gehalt von 11-17 % und ein M_r von 2,4-4 kDa auf. Wichtigstes Charakteristikum sind die wiederholten γ -Glutamylbindungen, die eine ribosomale Synthese ausschließen und PC von Proteinen prinzipiell unterscheiden. Im Gegensatz dazu stehen viele Berichte über MT-ähnliche Proteine und deren Schwermetall-induzierte Synthese in höheren Pflanzen, zum Beispiel Premakumar et al. (1975), Weigel und Jäger (1980), Bartolf et al. (1980), Rauser und Curvetto (1980), Casterline und Barnett (1982), Wagner und Trotter (1982), sowie Wagner (1984), die alle ein Schwermetall-bindendes Protein von ca. 10 kDa in differenzierten Pflanzen nachwiesen. In Agrostis gigantea (Rauser, 1984) und Brassica capitata (Wagner, 1984) wurden kleinere Molekulargewichte zwischen 2 und 4 kDa festgestellt. Zudem waren die Charakteristika - Absorptionsspektren, Aminosäurezusammensetzung, Hitzestabilität, Proteaseunempfindlichkeit und das Versagen des Edman-Abbaus - Eigenschaften, die perfekt mit denen der von Grill et al (1985 a) isolierten Phytochelatine übereinstimmen. Bei genauerer Betrachtung früherer Ergebnisse zu MT-ähnlichen Proteinen (siehe Kap. I) in Pflanzen scheinen die Daten uneinheitlich und zum Teil durchaus auch mit den Eigenschaften der PC vereinbar zu sein. Möglicherweise hatten die Autoren nicht ein MT-ähnliches Protein, sondern durch Proteine kontaminierte PC-Komplexe isoliert.

III.1.1 Identität von Phytochelatin-komplexen aus differenzierten Pflanzen und Suspensionskulturen

Nun galt es zu untersuchen, ob die von Grill charakterisierten PC allgemein gültig als Schwermetall-bindendes Prinzip im ganzen Pflanzenreich vorkommen. Außerdem mußte die Identität des PC aus Pflanzensuspensionskulturen mit in differenzierten Pflanzen induzierbarem, Schwermetall-bindenden Material nachgewiesen werden. Als Versuchsobjekte für dieses Vorhaben kamen zunächst neben den von anderen Autoren untersuchten Pflanzenarten vor allem Wasserpflanzen in Frage, weil bei deren Kultur störende Effekte des Substrates durch Festlegung des Cd^{2+} nicht zu befürchten waren. Zunächst wurden Rohextrakte aus Eichhornia crassipes (exakt nach Fujita (1985) angezogen und belastet), Lycopersicon esculentum (durch E. Grill exakt nach Bartolf et al. 1980 angezogen und belastet), Spirodela polyrhiza, Hordeum vulgare und Lactuca sativa (in Medium H kultiviert und mit $20 \mu\text{M}$ Cd^{2+} für 4 Tage belastet) durch Gelfiltration auf Sephadex G-50 untersucht. Aus diesen Rohextrakten wurde das Cd^{2+} -induzierbare und -bindende Material exakt nach der von Grill (1987) ausgearbeiteten Methode isoliert und die gefriergetrockneten Isolate mit HPLC mit Detektion bei 220 nm analysiert. Dabei wurde die induzierbare Synthese eines auf der G-50 Chromatographie zwischen den hoch- und niedermolekularen Substanzen eluierenden Materials festgestellt. In der HPLC-Analyse dieses Materials wurden säurelösliche Peptide gefunden, deren Retentionszeiten denen der PC-Monomeren entsprachen. Abbildung 3 stellt die Elutionsprofile der Gelfiltrationschromatographien und die zugehörigen HPLC-Analysen des Cd^{2+} -bindenden Materials von 3 Beispielen solcher Versuche dar. Diese Komplexe entsprachen in wichtigen Kriterien - Induzierbarkeit, M_r von ca. 4 kDa, Satz von säurelöslichen Peptiden mit charakteristischen Retentionszeiten in der HPLC-Analyse - exakt den Eigenschaften von PC. Grill (1987) isolierte in entsprechenden Versuchen Schwermetall-bindendes Material aus Brassica capitata exakt nach der Vorschrift von

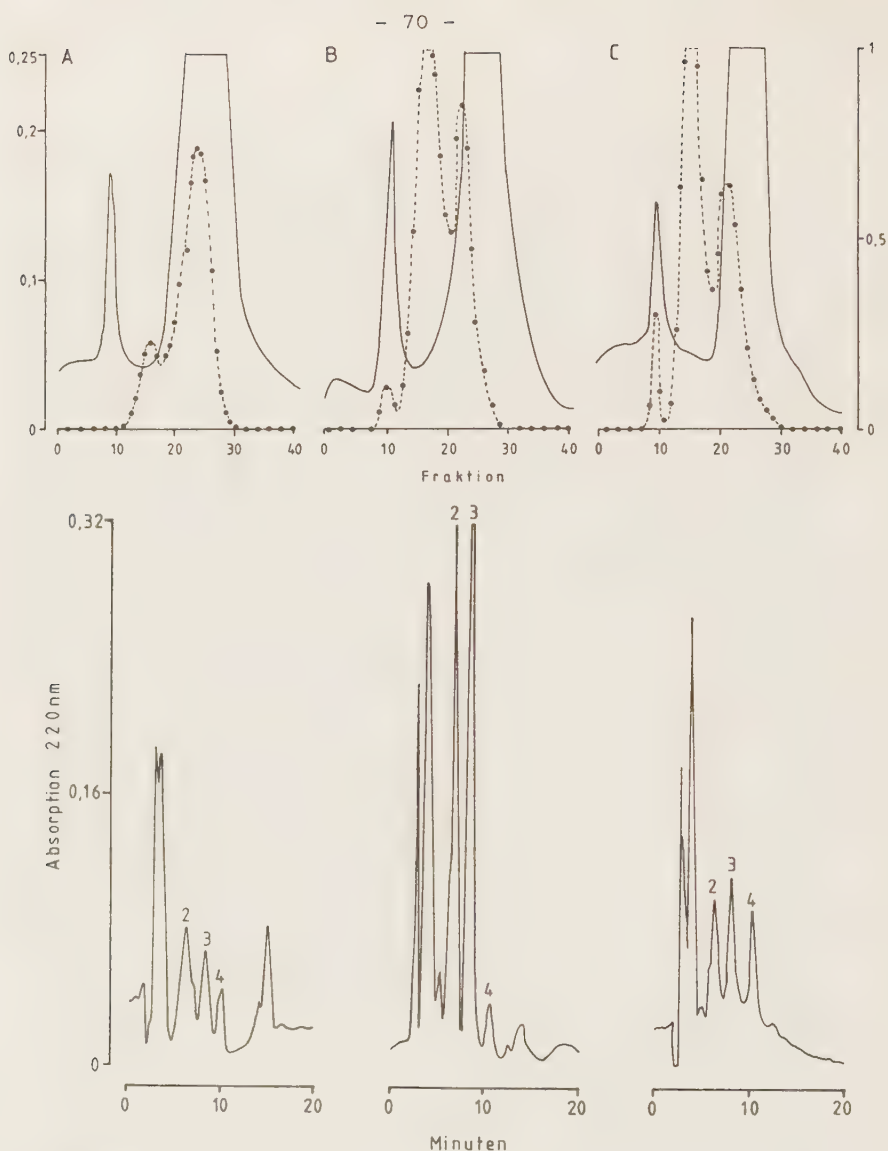


Abbildung 3

Elutionsprofile der Gelchromatographie auf Sephadex G-50 von Rohextrakten aus A) 52 g Wurzeln von *Eichhornia crassipes* (Anzucht und Belastung nach Fujita (1985), B) 32 g Wurzeln von *Hordeum vulgare* (Anzucht auf Vermiculit, Belastung 10 Tage mit $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$ im Gießwasser) und C) 10 g Wurzeln von *Lycopersicon esculentum* (Anzucht und Belastung nach Bartolf et al. (1980). Darunter: Elutionsprofile der HPLC-Analyse von Material aus den zentralen Fraktionen der G-50-Chromatographie, die gefriergetrocknet worden waren und A) 15%, B) 65% und C) 57% des applizierten Cd^{2+} enthielten. Die Indexzahlen n geben die Anzahl von Glu-Cys-Einheiten der zu den entsprechenden Zeiten eluierenden PC-Peptide aus *R. serpentina* an.

Wagner (1984) und wies durch Sequenzierung der Peptide mit den Verfahren für PC aus R. serpentina nach, daß es sich tatsächlich um PC handelte.

III.1.2 Aufbau eines "Screening"-Systems zum Nachweis der Fähigkeit zur Phytochelatinsynthese

In Anbetracht der Tatsache, daß damit den Ergebnissen sehr vieler Autoren widersprochen wird, und in der Hoffnung, Überproduzenten für PC zu finden, mußte nun eine taxonomisch möglichst breit angelegte Studie der Verbreitung des PC-Systems erfolgen. Das Auffinden PC-Synthese-defizienter Pflanzen würde interessante Objekte für Komplementationsstudien ermitteln. Für eine Analyse aller Ordnungen des Pflanzenreiches wäre das in den Vorversuchen angewandte Verfahren der Isolation der Komplexe und Sequenzierung der Peptide aber wegen der doch relativ großen nötigen Mengen Pflanzenmaterial und wegen der aufwendigen Versuchsdurchführung nicht praktikabel gewesen. Es mußte deshalb ein wesentlich empfindlicheres Analysenverfahren entwickelt werden. Außerdem mußte ein System zur schnellen Analyse kleiner Mengen vieler verschiedener Pflanzenarten geschaffen werden.

Die Analyse der PC-Peptide mit HPLC wurde in Zusammenarbeit mit E. Grill empfindlicher und für die Analyse von Rohextrakten geeignet gestaltet dadurch, daß dem Säuleneluat gepuffertes (wegen des sauren Laufmittels) Ellman-Reagens zugemischt, durch eine Reaktionsschleife (5 ml entsprechend 75 sec. Reaktionszeit) gepumpt und die Absorption bei 410 nm registriert wurde. Die Nachweisgrenze wurde dadurch von 20 auf 1 µg PC-Komplex gesenkt. Die SH-spezifische Detektion erlaubte es, auf die Abtrennung anderer, nicht-SH-positiver Peptide zu verzichten. Durch den Vergleich mit einem Rohextrakt aus einer nicht mit Cd^{2+} belasteten Pflanze wurde das induzierte Auftreten eines Satzes von SH-positiven Peptiden mit den Retentionszeiten der PC-Monomeren aus R. serpentina nachgewiesen und als Indiz für das Auftreten des PC-Systems in der jeweiligen Pflanze gewertet. Mit H_2O anstelle von

Reagens in der Nachsäulenderivatisierung wurde nachgewiesen, daß die Substanzen SH-positiv sind.

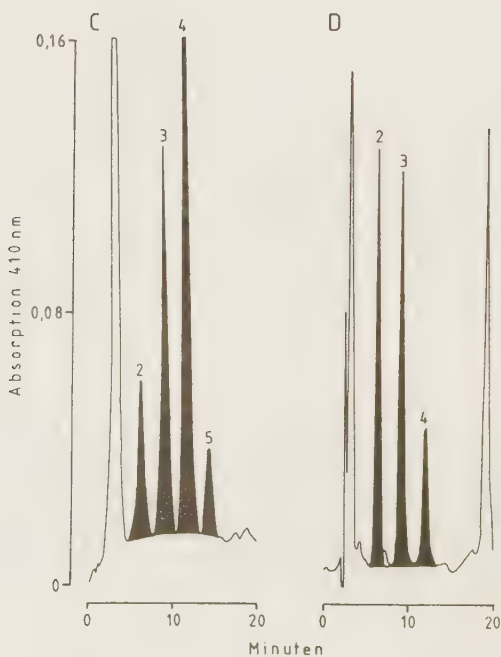
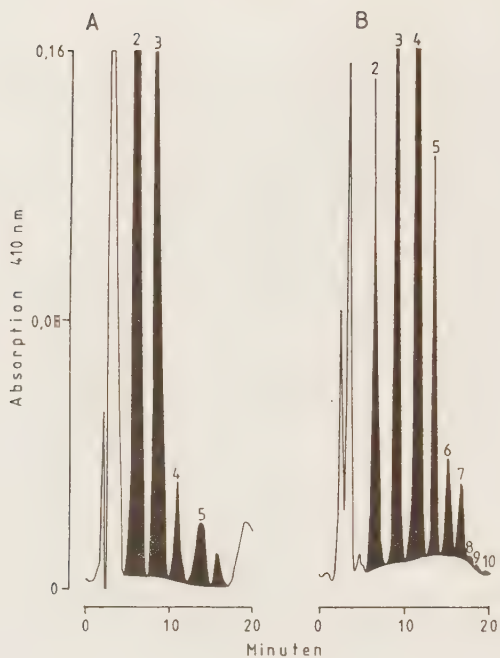
Um das Auftreten der PC-Synthese sicher zu erfassen, mußte der Aufschluß des Zellmaterials schnell und vollständig sein sowie die Oxidation der SH-Peptide vermeiden. Dazu wurde von E. Grill die Methode übernommen, das Pflanzengewebe zur Zerstörung von Membranstrukturen in stark alkalischem Milieu und mit Ultrabeschallung aufzuschließen und mit Borhydrid zu reduzieren. Die Reduktion stellte die Nachweisbarkeit der Peptide mit SH-spezifischer Detektion sicher. Eine Nachbehandlung des abzentrifugierten Niederschlages mit der selben Methode zeigte, daß der erste Aufschluß mindestens 90 % des PC in den Überstand brachte. Diese Methode wird im Folgenden als "Schnellaufschluß" bezeichnet. Aus 400 mg Gewebe wurden typischerweise zwischen 400 und 600 µl Extrakt erhalten, von dem 100 µl auf die Säule injiziert wurden. In Fällen, in denen besonders wenig Gewebe zur Verfügung stand, wurden 100 mg Gewebe in 250 µl Extrakt überführt und dieser vollständig auf die Säule appliziert.

Die letzte Schwierigkeit, die nun noch zu überwinden war, war ein verlässliches System zur Induktion Schwermetall-bindender Komplexe in beliebigen Pflanzen zu finden. Zunächst waren die besten Ergebnisse mit Suspensionskulturen erzielt worden, da bei diesen störende Einflüsse des Substrats und die Verfälschung der Versuche durch unterschiedliche Aufnahme- und Transportphänomene vermieden werden. Da die hauseigene Gewebekultursammlung, obschon sehr umfangreich, nicht für jede Ordnung des Pflanzenreiches ein Beispiel bereit hielt, wurde nach einem System gesucht, um in differenzierten Pflanzen schnell und sicher die PC-Synthese nachweisen zu können. Vorversuche zeigten, daß dazu abgeschnittene Zweige oder Blattstanzscheiben nicht geeignet waren, das Cd^{2+} wurde nicht in die Zellen aufgenommen bzw. induzierte keine PC-Komplexe. In Gelfiltrationsanalysen aus Rohextrakten dieser Gewebe eluierte das Cd^{2+} mit den niedermolekularen Substanzen (unter 500 Da, "freies" Cd^{2+}). Mit

diesem System hätte man mit kleinen Proben von im Botanischen Garten vorhandenen Pflanzen arbeiten können. Auf Erde oder in Vermiculit gekeimte Pflanzen zeigten -vermutlich wegen der Bindung des Schwermetalls an das Substrat und wegen der durch Bodenbakterien und oberflächliche Verletzung erfolgenden raschen Desensibilisierung der Wurzeln - keine verlässliche Schwermetallaufnahme und PC-Synthese. Als Ausweg blieb nur, aus Samen Keimlinge für Hydrokultur heranzuziehen. Das Auskeimen der Samen auf Zellstoff machte die Entfernung anhängenden Substrats von den Keimwurzeln unnötig, die Keimwurzeln wurden sodann durch kleine Löcher in Styroporflößen in Hydrokultur in Hoaglands Medium (Hoagland und Snyder, 1933) inkubiert, was zu reproduzierbarer Schwermetall-Aufnahme und PC-Synthese führte. So gelang es, die von verschiedensten Botanischen Gärten bezogenen Samen zur Keimung zu bringen und die Keimlinge in dem beschriebenen System zu inkubieren. Konstante Bedingungen in Klimakammern (Luftfeuchtigkeit 98%, Belichtung 1200 lux, Belastungsdauer 4 Tage) ermöglichten die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Weil Cd^{2+} sich in den bisherigen Experimenten als der potenteste Induktor erwiesen hatte und dieses Metall eines der relevantesten Umweltgifte ist (Schlee 1986, Becker 1986), wurde dieses Metall für die folgenden Experimente ausgewählt. Abbildung 4 zeigt 4 Beispiele für HPLC-Analysen mit SH-spezifischer Detektion. Bei Cornus mas und Phalaeonopsis Hybride (deren Keimlinge vivipar entstehen) dominiert PC2. Bei Gossypium herbaceum wurde besonders hohe PC-Induktion gefunden, PC4 dominiert, PC-Homologe bis zu $n = 10$ konnten lokalisiert werden. Auch bei Oenothera rosea dominiert PC4. Folgende Seite:

Abbildung 4

4 Beispiele für HPLC-Analysen des taxonomischen Überblicks. Je 0,4 g Wurzelgewebe von A: Cornus mas, B: Gossypium herbaceum, C: Oenothera rosea, D: Phalaeonopsis Hybride wurden mit der Schnellaufschlußmethode und HPLC mit SH-spezifischer Detektion analysiert. Schwarz ausgefüllte Flächen repräsentieren die einzelnen PC-Peptide, die mit den Indexzahlen n (Anzahl der Glu-Cys-Einheiten) bezeichnet sind. Die Pflanzen waren für 4 Tage mit $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$ belastet worden, in unbelasteten Kontrollen wurden keine PC-Peptide festgestellt.



III.1.4: Verbreitung der Phytochelatin-Synthesefähigkeit in Spermatophyta

Aus den Daten der automatischen Integration der HPLC wurde nach Kalibrierung mit GSH die Induktion der PC-Peptide auf das Trockengewicht bezogen errechnet. Die Ergebnisse stellen die auf den nächsten Seiten folgenden Tabellen 1 und 2 zusammen. Es wurden 90 Spezies aus 85 Gattungen von 48 Ordnungen der Dicotyledonae sowie 22 Spezies aus 22 Gattungen in 13 Ordnungen der Monocotyledonae untersucht. Dabei wurden bis zu 100-fache Unterschiede in der PC-Induktion gefunden (siehe letzte Spalte).

In der Hoffnung, PC-Überproduzenten zu erhalten, wurden aus einigen der Pflanzen mit besonders hoher PC-Induktion (Linum usitatissimum, Gossypium herbaceum, Ipomea purpurea, Tropaeolum majus) Gewebekulturen angelegt. Es zeigte sich jedoch, daß diese Gewebekulturen keine gegenüber zum Beispiel Silene cucubalus oder S. serpentina erhöhte PC-Syntheseleistung aufwiesen. Dies soll an einem Beispiel verdeutlicht werden: Ipomea purpurea (Dexifragale), wies als differenzierte Pflanze in der Wurzel eine PC-Induktion von 6,86 nmol Glu-Cys/mg TG auf, die aus denselben Samen angelegte Suspensionskultur synthetisierte nur 1,93 nmol Glu-Cys-Einheiten/mg TG im PC. In den Ordnungen, in denen viele der Schwermetall-pflanzen eingeordnet sind (Nitiales, Caryophyllales), wurden nicht nur besonders hohe PC-Induktionen gefunden.

Folgende Seiten:

Tabelle 1

PC-Synthese in Angehörigen der Dicotyledonae. Kontrollen wurden für 4-12 Tage mit 20-50 $\mu\text{M Co}^{++}$, Suspensionskulturen für 2-4 Tage während der logarithmischen Wachstumsphase mit 50-200 $\mu\text{M Co}^{++}$ belastet. Unbelastete Pflanzen dienten als Kontrolle, diese enthielten kein PC. Die Molmengen PC-Peptide und die in der letzten Spalte angegebene PC-Induktion (PC ind.: nmol Glu-Cys-Einheiten indiziert) wurden aus den HPLC-Integrationsflächen errechnet. Es bedeuten: wz.: Wurzel, bl.: Blatt, * : S= Suspensionskultur, D= differenzierte Pflanze; +: Med. (siehe Kap. II).

Tabelle 1 PC-Synthese in Angehörigen der Dicotyledonae

Art.	Ordnung	* +	PC2	PC3	PC4	PC5 (nmol/mg TG)	PC6	PC7	PC ind.
<i>Annona cherimola</i>	Annonales	S 4x	0.80	0.70	0.08	0.00	0.00	0.00	4.04
<i>Alangium lamarkii</i>	Araliales	S 4x	0.55	0.64	0.19	0.03	0.01	0.00	3.97
<i>Daucus carota</i>	Araliales	S 85	0.74	0.22	0.03	0.00	0.00	0.00	2.28
<i>Panax ginseng</i>	Araliales	S 1.5	0.18	0.14	0.01	0.00	0.00	0.00	0.84
<i>Aristolochia ringens</i>	Aristolochiales	S 4x	0.14	0.31	0.22	0.00	0.00	0.00	2.08
<i>Anthemis arvensis</i> wz.	Asterales	D H	0.18	0.65	1.10	0.05	0.00	0.00	6.95
<i>Artemisia absinthium</i> wz.	Asterales	D H	0.41	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.85
<i>Centaurea cyanus</i> bl.	Asterales	D H	0.22	0.20	0.29	0.05	0.00	0.00	2.47
<i>Centaurea cyanus</i> wz.	Asterales	D H	0.93	0.64	0.26	0.07	0.00	0.00	5.26
<i>Lactuca sativa</i>	Asterales	D H	0.04	0.01	0.03	0.02	0.00	0.00	0.32
<i>Borago officinalis</i>	Boraginales	D H	0.07	0.03	0.03	0.00	0.00	0.00	0.36
<i>Simmondsia californica</i>	Buxales	D H	0.74	0.21	0.07	0.01	0.00	0.00	2.40
<i>Campanula medium</i>	Campanulales	D H	0.00	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.10
<i>Sinapis alba</i> wz.	Capparales	D H	0.49	0.73	0.63	0.20	0.00	0.00	6.70
<i>Arabisopsis thaliana</i>	Capparales	D H	0.01	0.03	0.02	0.00	0.00	0.00	0.30
<i>Agrostemma githago</i>	Caryophyllales	D H	0.05	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.21

Fortsetzung Tabelle 1

Art	Ordnung	+	+	PC2	PC3	PC4 (mmol ml ⁻¹ TN)	PC5 (mmol ml ⁻¹ TN)	PC6	PC7	PC inkl.
<i>Beta vulgaris</i>	Caryophyllales	S	MS	0.33	0.39	0.03	0.00	0.00	0.00	1.68
<i>Minuartia verna</i>	Caryophyllales	S	LS	0.59	0.57	0.06	0.03	0.00	0.00	3.27
<i>Silene cucubalus</i>	Caryophyllales	S	LS	0.63	0.23	0.06	0.03	0.00	0.00	2.35
<i>Spinacia oleracea</i>	Caryophyllales	D	H	0.08	0.04	0.01	0.00	0.00	0.00	.22
<i>Phytolacca americana</i>	Caryophyllales	D	H	0.22	0.12	0.02	0.00	0.00	0.00	.87
<i>Portulaca grandiflora</i>	Caryophyllales	D	H	0.15	0.04	0.01	0.00	0.03	0.00	.45
<i>Maythenus serrata</i>	Celastrales	D	H	0.50	0.19	0.02	0.00	0.00	0.00	1.66
<i>Hippocratea velletina</i>	Celastrales	D	H	0.30	0.12	0.01	0.00	0.00	0.00	1.00
<i>Cornus mas</i>	Cornales	D	H	0.38	0.13	0.01	0.01	0.00	0.00	1.30
<i>Cornus sanguinea</i>	Cornales	D	H	0.26	0.05	0.02	0.00	0.00	0.00	.75
<i>Cucumis sativus</i>	Cucurbitales	D	H	0.34	0.41	0.14	0.00	0.00	0.00	2.48
<i>Momortica charanthia</i>	Cucurbitales	S	LS	0.13	0.11	0.03	0.00	0.00	0.00	.69
<i>Valeriana officinalis</i>	Dipsacales	D	H	0.09	0.07	0.03	0.00	0.00	0.00	.49
<i>Drosera intermedia</i>	Proserales	S	4x	0.04	0.17	0.03	0.00	0.00	0.00	.70
<i>Styrax officinalis</i>	Ebenales	D	H	0.00	0.20	0.77	0.32	0.03	.00	5.50
<i>Hippophae rhamnoides</i>	Elaeagnales	D	H	0.09	0.04	0.08	0.00	0.00	.00	.64

Fortsetzung Tabelle 1

Art	Ordnung	*	+	PC2	PC3	PC4 (nmol/mg TG)	PC5	PC6	PC7	PC ind.
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	Ericales	S	4x	0.10	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.44
<i>Eucommia ulmoides</i>	Eucommiales	S	4x	2.12	0.36	0.14	0.00	0.00	0.00	5.87
<i>Euphorbia lathyris</i> wz.	Euphorbiales	D	H	0.02	0.05	0.04	0.00	0.00	0.00	0.37
<i>Fagus sylvatica</i>	Fagales	D	H	0.01	0.03	0.01	0.01	0.00	0.00	0.21
<i>Quercus robur</i>	Fagales	S	4x	0.07	0.05	0.01	0.00	0.00	0.00	0.31
<i>Coffea arabica</i>	Gentianales	S	4x	0.06	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16
<i>Galium mollugo</i>	Gentianales	S	LS	0.04	0.05	0.02	0.00	0.00	0.00	0.30
<i>L. usitatissimum</i>	Geraniales	D	H	0.00	1.78	0.46	1.03	0.38	0.00	14.68
<i>Linum usitatissimum</i> wz.	Geraniales	D	H	0.06	0.14	0.18	0.01	0.01	0.00	1.40
<i>Hippuris vulgaris</i>	Hippuridales	D	H	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04
<i>Juglans regia</i> wz.	Juglandales	D	H	0.03	0.02	0.02	0.01	0.00	0.00	0.22
<i>Mentha piperita</i>	Lamiales	D	H	0.01	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.14
<i>Salvia cadmica</i>	Lamiales	D	H	0.27	0.29	0.30	0.00	0.00	0.00	2.60
<i>Laurus nobilis</i>	Laurales	D	H	0.71	0.30	0.55	0.58	0.12	0.09	8.75
<i>Loasa vulcanica</i>	Loasales	D	H	0.13	0.32	0.32	0.08	0.00	0.00	2.89
<i>Gossypium herbaceum</i>	Malvales	D	H	0.24	0.21	0.23	0.06	0.02	0.01	2.50

Fortsetzung Tabelle 1

Art	Ordnung	*	+	PC2	FC3	PC4	PC5 (nmol/mg TG)	PC6	PC7	PC ind.
<i>Malva sylvestris</i> wz.	Malvales	D	H	0.04	0.09	0.02	0.00	0.00	0.00	0.42
<i>Oenothera rosea</i>	Myrtales	D	H	0.14	0.22	0.30	0.04	0.00	0.00	2.34
<i>Oenothera annophila</i>	Myrtales	D	H	0.22	0.31	0.38	0.06	0.00	0.00	3.22
<i>Oenothera biennis</i>	Myrtales	D	H	0.09	0.01	0.05	0.00	0.00	0.00	0.45
<i>Oenothera mollissima</i>	Myrtales	D	H	0.18	0.09	0.17	0.00	0.00	0.00	1.32
<i>Punica granatum</i>	Myrtales	D	H	0.06	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.19
<i>Nymphaea mexicana</i>	Nymphaeales	D	H	0.45	0.15	0.07	0.00	0.00	0.00	1.63
<i>Ligustrum vulgare</i>	Oleales	S	4x	0.02	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19
<i>Syringa vulgaris</i>	Oleales	S	B5	0.01	0.05	0.01	0.00	0.00	0.00	0.20
<i>Papaver somniferum</i>	Papaverales	D	H	0.09	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.41
<i>Argemone hispida</i>	Papaverales	S	LS	0.05	0.09	0.01	0.00	0.00	0.00	0.39
<i>Chelidonium majus</i>	Papaverales	S	LS	0.09	0.22	0.01	0.00	0.00	0.00	0.88
<i>Peperomia berniereana</i>	Piperiales	D	H	0.16	0.37	0.08	0.00	0.00	0.00	1.76
<i>Piper nigrum</i>	Piperiales	D	H	0.09	0.21	0.09	0.00	0.00	0.00	1.20
<i>Armeria vulgaris</i>	Plumbaginales	D	H	0.08	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.23

Fortsetzung Tabelle 1

Art	Ordnung	* +	PC2	PC3	PC4	PC5 (nmol/mg TG)	PC6	PC7	PC ind.
Fagopyrum esculentum	Polygonales	D H	0.17	0.08	0.04	0.01	0.05	0.00	1.06
Polygonum tinctorium	Polygonales	D H	0.22	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.16
Primula capitata	Primulales	D H	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09
Grevillea robusta	Proteales	D H	0.06	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.22
Grevillea thellmanniana	Proteales	D H	1.36	0.59	0.08	0.00	0.00	0.00	4.80
Aquilegia chrysantha	Ranunculales	S LS	0.06	0.07	0.27	0.01	0.00	0.00	1.49
Berberis stolonifera	Ranunculales	S LS	0.09	0.06	0.10	0.02	0.00	0.00	0.87
Rhamnus catharticus	Rhamnales	D H	0.24	0.05	0.06	0.00	0.00	0.00	0.88
Malus sylvestris	Rosales	S 4x	0.04	0.07	0.10	0.00	0.00	0.00	0.66
Rosa canina	Rosales	S LS	0.34	0.08	0.01	0.00	0.00	0.00	0.93
Ruta graveolens wz.	Rutales	D H	0.47	0.48	0.02	0.03	0.03	0.00	2.80
Azadirachta indica	Rutales	S DAX	0.02	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18
Salix viminalis wz.	Salicales	D H	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06
Aesculus hippocastanum wz.	Sapindales	D H	0.05	0.17	0.21	0.09	0.03	0.02	2.21
Ipomea purpurea wz.	Saxifragales	D H	0.28	0.85	0.87	0.03	0.02	0.00	6.86
Ipomea purpurea	Saxifragales	S LS	0.22	0.20	0.17	0.04	0.00	0.00	1.93

Fortsetzung Tabelle 1

Art	Ordnung	* +	PC2	PC3	PC4	PC5 (nmol/mg TG)	PC6	PC7	PC ind.
Kalanchoe tubiflora	Saxifragales	D H	0.32	0.59	0.11	0.00	0.00	0.00	2.85
Sesamum indicum bl.	Scrophulariales	D H	0.04	0.10	0.05	0.01	0.00	0.00	0.59
Sesamum indicum wz.	Scrophulariales	D H	0.12	0.20	0.09	0.00	0.00	0.00	1.19
Capsicum annuum	Solanales	S DAX	0.17	1.51	0.94	0.30	0.07	0.00	10.56
Duboisia myopuroides	Solanales	S 4x	0.04	0.03	0.02	0.00	0.00	0.00	0.25
Hyoscyamus niger wz.	Solanales	S LS 6	0.22	0.13	0.05	0.00	0.00	0.00	1.04
Nicotiana tabacum	Solanales	S 4x	0.02	0.07	0.04	0.01	0.00	0.00	0.41
Petunia hybrida	Solanales	S LS	0.07	0.19	0.12	0.00	0.00	0.00	1.18
Thea sinensis	Theales	D H	0.00	0.29	0.26	0.05	0.01	0.00	2.21
Tropaeolum majus wz.	Tropaeolales	D H	0.25	0.18	0.57	0.33	0.07	0.00	5.39
Cannabis sativa wz.	Urticales	D H	2.18	3.16	0.60	0.01	0.00	0.00	16.29
Urtica cannabina	Urticales	D H	0.10	0.16	0.02	0.00	0.00	0.00	0.75
Viola tricolor	Violales	D H	0.15	0.11	0.09	0.01	0.00	0.00	1.01
Begonia semperflorens	Violales	D H	0.03	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.21
Viola calaminaria	Violales	S LS	0.94	1.55	0.45	0.14	0.00	0.00	9.03

Tabelle 2: PC-Synthese in Angehörigen der Monocotyledonae

Art	Ordnung	* +	PC2	PC3	PC4 (nmol/mg TG)	PC5	PC6	PC ind.
<i>Alisma lanceolata</i>	Alismatales	D H	0.05	0.14	0.09	0.01	0.00	0.93
<i>Lemna gibba</i>	Arales	D H	0.54	0.67	0.20	0.00	0.00	3.89
<i>Pinellia tripartita</i> bl.	Arales	D H	0.07	0.04	0.02	0.00	0.00	0.36
<i>Pistia stratiotes</i>	Arales	D H	0.39	0.58	0.73	0.04	0.00	5.64
<i>Phoenix dactylifera</i> bl.	Arecales	D H	1.10	0.61	0.28	0.01	0.00	5.18
<i>Asparagus officinalis</i> bl.	Asparagales	D H	1.82	0.33	0.09	0.00	0.00	4.97
<i>Ananas comosus</i>	Bromeliales	S DAX	0.86	0.24	0.07	0.00	0.00	2.71
<i>Casuarina equisetifolia</i>	Casuarinales	D H	0.20	0.07	0.02	0.00	0.00	0.69
<i>Commelina graminifolia</i> wz.	Commelinales	D H	0.31	0.32	0.08	0.00	0.00	1.89
<i>Cyperus esculentus</i> wz.	Cyperales	D H	0.84	0.68	0.27	0.11	0.03	5.53
<i>Dioscorea composita</i>	Dioscoreales	S 4x	1.06	0.85	0.34	0.15	0.04	6.99
<i>Hippeastrum vittatum</i>	Liliales	S LS	0.20	0.04	0.01	0.00	0.00	0.59
<i>Phalaenopsis Hybride</i> wz.	Orchidales	D H	0.11	0.08	0.02	0.00	0.00	0.55
<i>Agrostis tenuis</i>	Poales	S DAX	1.39	0.50	0.09	0.00	0.00	4.63
<i>Avena sativa</i> wz.	Poales	D H	0.59	0.45	0.14	0.00	0.00	3.09
<i>Hordeum vulgare</i> wz.	Poales	D H	0.19	0.18	0.06	0.00	0.00	1.16

Fortsetzung Tabelle 2

Art	Ordnung	*	+	PC2	PC3	PC4 (nmol/mg TG)	PC5	PC6	PC ind.
Oryza sativa wz.	Poales	D	H	0.05	0.09	0.02	0.00	0.00	0.44
Secale cereale wz.	Poales	D	H	0.60	0.35	0.15	0.01	0.00	2.88
Triticum aestivum wz.	Poales	D	H	0.93	0.74	0.07	0.00	0.00	4.38
Zea mays wz.	Poales	D	H	0.24	0.05	0.02	0.00	0.00	0.69
Eichhornia crassipes bl.	Pontederiales	D	H	0.38	0.09	0.05	0.00	0.00	1.23
Musa ensete wz.	Zingiberales	D	H	0.47	0.30	0.09	0.05	0.00	2.42
Zingiber officinalis	Zingiberales	S	DAX	0.33	0.08	0.05	0.00	0.00	1.07

Tabelle 2

PC-Synthese in Angehörigen der Monocotyledonae. Keimlinge wurden für 4-12 Tage mit 20-50 µM Cd²⁺, Suspensionskulturen für 2-4 Tage während der logarithmischen Wachstumsphase mit 50-200 µM Cd²⁺ belastet. Unbelastete Kontrollen erhielten kein PC. Die Molmengen PC-Peptide und die in der letzten Spalte angegebene PC-Induktion (PC ind.; nmol Glu-Cys-Einheiten induziert) wurden aus den HPLC-Integrationsflächen berechnet. Es bedeuten: wz.: Wurzel, bl.: Blatt, *: S= Suspensionskultur, D = differenzierte Pflanze; +: Medium (siehe Kap. II)

Bei den Caryophyllales zum Beispiel ist Mimulus verna (die Miere, eine Schwermetall-Zeigerpflanze) mit 3,27 nmol Glu-Cys-Einheiten/mg TG hinsichtlich ihrer PC-Syntheseleistung durchaus vergleichbar mit Beta vulgaris, der roten Rübe (1,68 nmol Glu-Cys-Einheiten/mg TG), die nicht als besonders schwermetalltolerante Pflanze bekannt ist. Arten von Phytolacca und Portulacca, ebenfalls Angehörige der Caryophyllales wiesen keine hohe PC-Induktion auf (0,97 bzw. 0,45 nmol Glu-Cys/mg TG). Von den Gewebekulturen wiesen Eucommia ulmoides (5,87 nmol Glu-Cys/mg TG) und Capsicum annuum (12,56 nmol Glu-Cys/mg TG) die höchsten PC-Induktionen auf. Wegen des geringen Massenzuwachses der Gewebekulturen auch in unbelasteten Zustand waren diese Kulturen jedoch nicht besser zur PC-Produktion geeignet als zum Beispiel die Suspensionskulturen von R. serpentina oder Mimulus verna. Die Kultur von R. serpentina ließ sich mit 600 μM Cd^{2+} bis zu 20 nmol Glu-Cys-Einheiten/mg TG bei 14 g TG/l induzieren, das sind 70 mg PC-Peptide oder 100 mg PC-Komplex /Liter Kultur. Von M. verna wurden in dem in Tab. 1 aufgeführten Fall bei 17 g TG/l immerhin 14 mg PC-Peptide/Liter Kultur synthetisiert.

In den Fällen, in denen differenzierte Pflanze und Suspensionskultur untersucht wurden, zeigte sich in der Mehrzahl der Fälle die Suspensionskultur zur PC-Produktion überlegen. Angehörige der Solanales, die sich als differenzierte Pflanze nur schwer zur PC-Synthese induzieren ließen, zeigten als Gewebekulturen befriedigende Ergebnisse (Arten von Petunia, Capsicum, Hyoscyamus). Von besonderem Interesse war die PC-Synthese in Arabidopsis thaliana, einer genetisch besonders gut untersuchten Pflanze mit sehr kleinem Genom (80 Mbp, zum Vergleich: E.coli: 4,7 Mbp, Drosophila: 400 Mbp und Mensch: 3000 Mbp). Auch Angehörige der Gattung Oenothera, die vielfach zu genetischen Experimenten herangezogen wird, synthetisieren PC. Diese Pflanzen dürften also das bevorzugte Versuchsobjekt sein, wenn es darum geht die genetische Grundlage für die PC-Synthese zu analysieren. Andererseits wurde aber in dieser Untersuchung kein einziger Spermatophyt

festgestellt, in dem die PC-Synthese eindeutig ausgeschlossen werden konnte. Eine eindeutig PC-defiziente Pflanze könnte als Objekt für Komplementationsanalysen dienen. Weiterhin ist von besonderem Interesse, daß sämtliche untersuchten Nahrungs-, Gemüse-, Genuß- und Gewürzpflanzen ebenfalls PC synthetisierten. Vor allem die weltweit bedeutendsten Nahrungspflanzen, Roggen, Gerste, Weizen, Reis und Mais, nämlich Angehörige der Poales, zeigten zum Teil erhebliche PC-Induktion von 0,44 nmol Glu-Cys-Einheiten/mg TG (Reis) bis 4,38 nmol Glu-Cys/mg TG (Weizen). Das in diese Pflanzen aufgenommene Cd^{2+} ist also an PC gebunden, und somit ist dieser Komplex für ernährungsphysiologische Studien relevant, was in dieser Arbeit im Kapitel III.5 berücksichtigt wird.

III.1.5 Verteilung der Phytochelatine in verschiedenen Organen differenzierter Pflanzen

In einigen Fällen wurde die Verteilung des PC zwischen Wurzel und Sproß bzw. Blättern untersucht (*Centaurea cyanus*, *Tesamum indicum*) und festgestellt, daß höhere PC-Akkumulation in den Wurzeln als in den Blättern stattfand. Dies reflektiert wohl die Tatsache, daß bei der kurzen Belastungsdauer (4 Tage) sich das PC noch am Ort seiner Synthese in den Zellen der Wurzel befand. Cataldo et al. (1981) hatten an Sojabohnen festgestellt, daß cadmiumbindende Komplexe während der Vegetationsdauer der Pflanzen mobil sind und in verschiedenen Organen angehäuft gefunden werden. In einem Experiment wurde deshalb an *Nicotiana tabacum* (von Tabak werden nur die Blätter zum Genuß verwendet) die im Lauf der Belastung sich ändernde Verteilung des PC verfolgt. Abbildung 5 zeigt HPLC-Chromatogramme aus Rohextrakten von Wurzeln und Blättern einer Tabakpflanze, die 3 Monate auf Cd^{2+} -belastetem Vermiculit gewachsen war. Zunächst war an dieser Pflanze keine PC-Synthese festgestellt worden (wohl wegen der Festlegung des Cd^{2+} im Substrat). Nach 2 Wochen fanden sich geringe Mengen PC, zunächst aber nur in den Wurzeln.

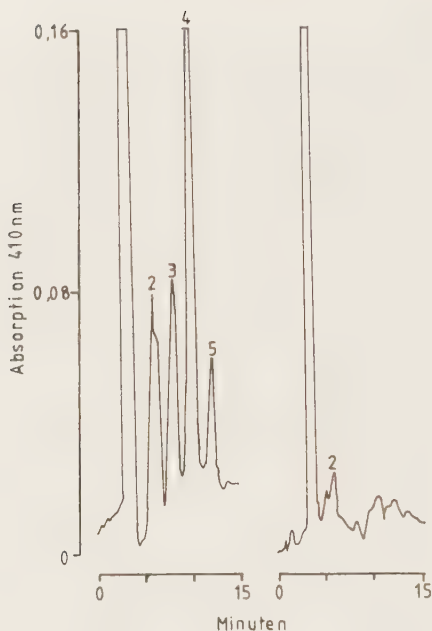


Abbildung 5

HPLC-Analyse mit SH-spezifischer Detektion von Schnellaufschlüssen aus Blatt- (links) und Wurzelgewebe (rechts) von *Nicotiana tabacum*, die 3 Monate auf Cd^{2+} -belastetem Vermiculit gewachsen war. Die Injektionen entsprachen je 80 mg Gewebe. Die Indexzahlen n geben die Anzahl von Glu-Cys-Einheiten in PC an.

Mit längerer Versuchsdauer nahm die Pflanze immer mehr des Schwermetalls auf. Schließlich war das Cd^{2+} und PC zu fast 100 % in den Blättern zu finden. Dies entspricht den Befunden, die Cataldo *et al.* (1981) bezüglich des Verbleibs von Cd^{2+} an Sojabohnenpflanzen erhielten. Verteilung und Transport von PC und Cd^{2+} gehen also vermutlich parallel von-statten.

Wie Abbildung 6 belegt, wurde PC in Ausnahmefällen auch in Pflanzenmaterial gefunden, das nicht im Versuch mit Cd^{2+}

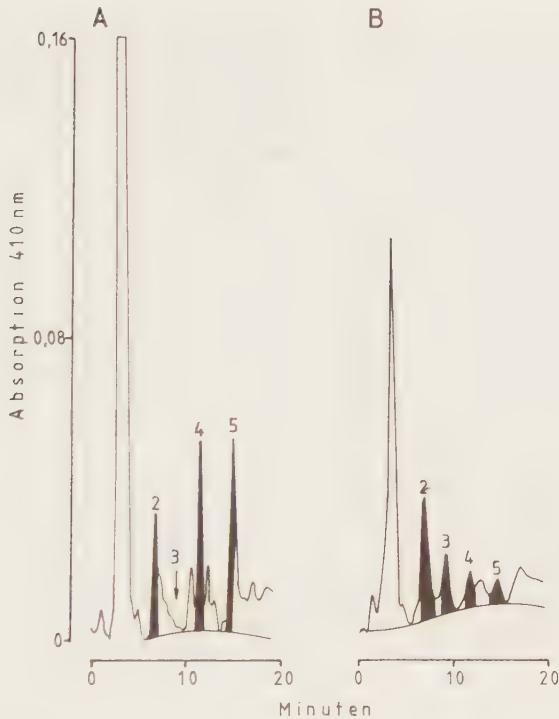


Abbildung 6

HPLC-Analyse mit SH-spezifischer Detektion von A: Samen von Sinapis alba, die im örtlichen Einzelhandel erworben wurden, und B: Pflanzen von Ranunculus fluitans, die aus der Würrn nahe Leutstetten gesammelt worden waren. Schwarz ausgefüllte Flächen repräsentieren die einzelnen PC-Peptide, die mit den Indexzahlen n (Anzahl der Glu-Cys-Einheiten) bezeichnet sind.

belastet worden war. Einige der untersuchten Samen (z. B. von Senf, aber auch Sesam) enthielten bereits PC, ebenso wie die daraus gezogenen Keimlinge, ohne im Versuch mit Cd^{2+} belastet worden zu sein. Die Pflanzen waren vermutlich auf schwermetallhaltigen Böden gewachsen. Auch einige Pflanzen des Wasserhahnenfußes (Ranunculus fluitans) enthielten bereits in den Kontrollpflanzen nennenswerte Mengen PC: hier

ist wohl der Schwermetallgehalt des Würmwassers, in dem die Pflanzen gewachsen waren, verantwortlich. Dies belegt, daß auch am natürlichen Standort (die Pflanzen von R. fluitans waren aus dem Bachbett der Würm nahe Leutstetten gesammelt worden) der Pflanzen PC-Synthese stattfindet.

III.1.6 Phytochelatine in Nacktsamern

Nachdem Grill et al. (1985 a) PC bereits in metallbelasteten Suspensionskulturen von Abies grandis und Picea abies nachgewiesen hatten, gelang es, PC auch in anderen Gymnospermen nachzuweisen. PC-Synthese wurde sowohl in differenzierten Pflanzen als auch in Suspensionkulturen gefunden. Allerdings waren hier nicht frische Keimlinge zur PC-Synthese zu induzieren, erst mit einjährigen Pflänzchen gelang dies mit dem Hydrokultursystem. Die wegen ihrer phylogenetischen Sonderstellung als fiederblättrige (im Erscheinungsbild Baumfarnartige) Nacktsamer interessante Gattung Cycas konnte an einem Beispiel (Cycas revoluta) untersucht werden, indem ein Seitentrieb eines adulten Baumes aus der Sammlung des Botanischen Gartens München in Erde bewurzelt wurde. Die pfahlwurzelartig austreibende junge Wurzel konnte problemlos von der Erde gesäubert werden und die Pflanze im oben beschriebenen System mit Cd^{2+} belastet werden, ganz im Gegensatz zu den Erfahrungen mit den Keimlingen der Angiospermen. Tabelle 3 stellt die in der Abteilung Gymnospermae weniger zahlreichen positiven Ergebnisse zusammen: Beispiele aus 2 von 3 Klassen der Gymnospermae belegen, daß auch die Nacktsamer Cd^{2+} mit dem PC-System komplexieren.

Nur wenige Ordnungen der Spermatophyta konnten nicht untersucht werden, weil entweder die Samen nicht keimten (z. B. Magnolia) oder keine Samen zu bekommen waren (z. B. Podostemon). 25 Ordnungen, hauptsächlich vergleichsweise Artenarme, der 73 Ordnungen der Dicotyledonae und 14 Ordnungen von 27 der Monocotyledonae, sowie 2 der 5 Ordnungen der Gymnospermae mußten ununtersucht bleiben. Die untersuchten Ordnungen repräsentieren aber die überwiegende Mehrzahl der Arten des

Art	Ordnung	*	+	PC2	PC3	PC4	PC5	PC ind.
				nmol/mg TG				
Cycas revoluta	Cycadatae	D	H	4.5	3.0	0.6	0.3	22.1
Gingko biloba	Gingkoatae	S	DAX	1.3	1.0	1.1	0.9	14.8
Abies alba	Pinales	D	H	3.8	2.0	0.0	0.0	13.7
Abies grandis	Pinales	S	4x	0.9	0.2	0.0	0.0	2.3
Picea abies	Pinales	D	H	1.5	0.1	0.0	0.0	3.4
Pinus pinea	Pinales	S	4x	6.8	1.2	0.2	0.0	18.0
Pinus sylvestris	Pinales	D	H	2.5	0.5	0.3	0.0	7.6

Tabelle 3

PC-Synthese in Angehörigen der Gymnospermae. Keimlinge wurden für 4-12 Tage mit 20-50 μM Cd^{2+} , Suspensionskulturen für 2-4 Tage während der logarithmischen Wachstumsphase mit 50-200 μM Cd^{2+} belastet. Unbelastete Kontrollen enthielten kein PC. Die Molmengen PC-Peptide und die in der letzten Spalte angegebene PC-Induktion (PC ind.; nmol Glu-Cys-Einheiten induziert) wurden aus den HPLC-Integrationsflächen errechnet. Es bedeuten: * S= Suspensionskultur, D = differenzierte Pflanze; +: Medium (siehe Kap. II)

Pflanzenreichs, wie aus den schraffierten Flächen der Abbildung 7 zu ersehen ist. Hier sind die bisher vorgestellten Ergebnisse graphisch dargestellt. Das Angiospermensystem nach Dahlgren (1980) stellt die Artenzahl der Ordnungen annähernd durch die Größe von Flächen dar. Die räumliche Nähe dieser Flächen spiegelt nach Möglichkeit den Verwandtschaftsgrad wieder. Dieses System wurde durch eine entsprechende Darstellung der Gymnospermae ergänzt und die Ordnungen, in denen Vertreter PC-Synthese zeigten, hervorgehoben. Alle untersuchten Spermatophyten synthetisierten nach Belastung mit Cd^{2+} PC-Peptide. Abschließend wird auf die senkrechte Schraffur in der Abb. 7 in der Ordnung Fabales hingewiesen, die uns zum nächsten Kapitel überleitet, in dem eine Besonderheit dieser Ordnung untersucht wird.

Abbildung 7

Querschnitt durch den Stammbaum der Spermatophyta nach Dahlgren (1980), ergänzt mit Gymnospermae. Die Flächen repräsentieren in etwa die Artenzahl der jeweiligen Ordnung, die räumliche Nähe entspricht nach Möglichkeit dem Verwandtschaftsgrad. Querschraffiert: PC gefunden, weiße Flächen: nicht untersucht, senkrechte Schraffur in Fabales: siehe Kap. III.2.

III.2: Phytochelatin und Homo-Phytochelatin in Fabales

Beim Anfertigen des taxonomischen Überblicks über die Verbreitung der PC-Synthese in Angehörigen der Spermatophyta fiel auf, daß zwar Pisum sativum, die Erbse, PC-Peptide mit den gleichen Retentionszeiten wie PC aus R. serpentina synthetisiert, daß aber andere Vertreter der Ordnung Fabales, zum Beispiel Phaseolus vulgaris, die Bohne, und P. aureus, die Mungobohne einen induzierbaren Satz von SH-positiven Peptiden synthetisierten, bei dem die Retentionszeiten der niederen Homologen gegenüber PC meßbar (um 45 sec. bei PC2) verschoben waren. Abbildung 8 zeigt einige beispielhafte Chromatogramme der Analysen von Vertretern der Fabales. In Pisum sativum wurde ein Satz von identisch mit den PC-Peptiden aus R. serpentina eluierenden Substanzen gefunden. Im Schnellaufschluß aus Phaseolus aureus (Mungobohne) traten die Peptide mit verschobenen Retentionszeiten auf. Die Co-chromatographie des Rohextraktes aus P. aureus mit PC aus R. serpentina belegt diesen Unterschied, die gemischten Peptide wurden zu Doppelpeaks aufgelöst. In Lathyrus ochrus (Platterbse) wurden direkt im Schnellaufschluß dieselben Doppelpeaks, also ein von der Pflanze synthetisiertes Gemisch beider Sätze von SH-positiven Peptiden gefunden. Das PC2 entsprechende Peptid eluierte 45 sec später als PC2 aus R. serpentina; das PC4 entsprechende Peptid eluierte nur 15 sec. später und war nur mit HPLC-Säulen von besonders hoher Trennleistung vom Vergleichs-peptid aus R. serpentina zu unterscheiden. Die höheren Homologen waren in ihren Retenti-

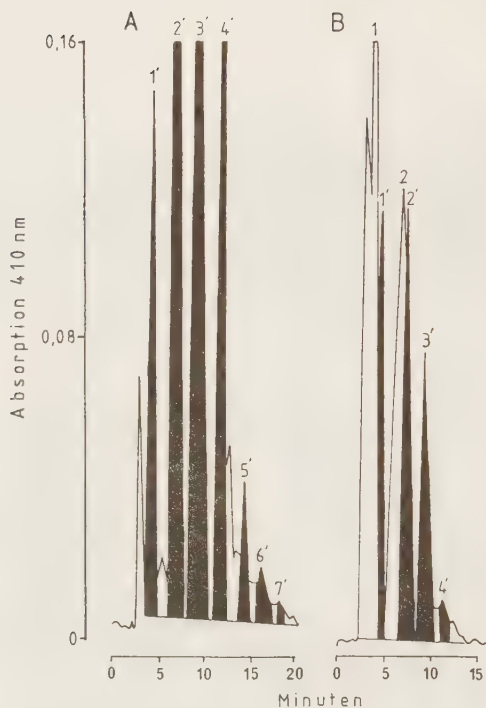
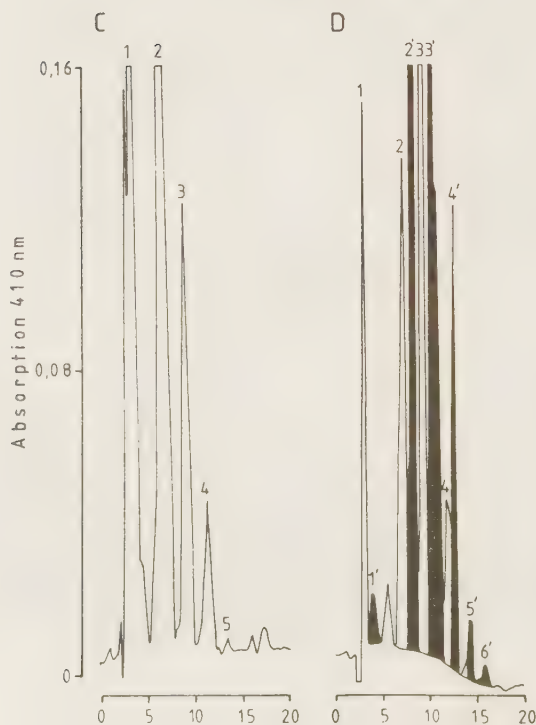


Abbildung 8

Elutionsprofile von HPLC-Analysen mit SH-spezifischer Detektion von Angehörigen der Fabales. Von Schnellaufschlüssen aus je 0,4 g Gewebe wurden 100 µl entsprechend 80 mg Gewebe analysiert. A: *Phaseolus aureus* Suspensionskultur in LS, B: *Lathyrus ochrus* Wurzeln, C: *Pisum sativum* Wurzeln (PC-Peptide eluieren identisch mit PC aus *R. serpentina*), D: *Phaseolus aureus* + 50 µg PC aus *R. serpentina*. Offene Flächen entsprechen GSH und PC, schwarz ausgefüllte Flächen hGSH und hPC, die jeweils mit den Indexzahlen n bzw. n' für die Anzahl der Glu-Cys-Einheiten bezeichnet sind.



onszeiten nicht von den Peptiden aus R. serpentina und P. sativum zu unterscheiden. Den größten Unterschied in der Retentionszeit wies ein in P. aureus konstitutiv vorhandenes Peptid auf, das eine Minute später als GSH eluierte und diesem auf ähnliche Weise entsprechen mußte wie die induzierbaren Peptide dem PC. In der Literatur wurden Arbeiten gefunden, die sich mit dem Vorkommen von Thiolpeptiden in Angehörigen der Ordnung Fabales beschäftigt hatten. Price (1957) hatte ein von GSH unterscheidbares Thiol-Peptid aus Phaseolus vulgaris, Phaseolus limensis, Glycine max und Trifolium repens isoliert, während in Arachis hypogea (Erdnuß), Albizzia julibrissin und Pisum sativum normales GSH gefunden wurde. Carnegie (1963) isolierte ein Peptid aus Phaseolus aureus (Mungobohne), das sich von GSH durch ein carboxyterminales β -Alanin anstelle von Glycin unterschied. Dieses Peptid ließ sich chromatographisch von GSH abtrennen und wurde **Homoglutathion** (im Folgenden mit hGSH abgekürzt) genannt. Normales GSH wurde nicht oder in maximal 5 % der Menge an hGSH gefunden. Das Molekül blieb lange Zeit ununtersucht, bis Macnicol und Bergmann (1984) nachwiesen, daß hGSH die Aufgabe des Schwefeltransports im sich entwickelnden Mungobohnenkeimling übernimmt, in seiner Funktion also GSH entspricht (Rennenberg 1982). Dies ist im Zusammenhang mit der Vermutung, daß PC aus GSH synthetisiert wird, wie durch die Struktur aus alternierenden γ -Glu-Cys-Einheiten, mit Gly am Carboxyterminus nahegelegt wird, ein interessantes Faktum. Sollte also PC wirklich aus GSH synthetisiert werden, so sollte aus hGSH ein Homolog zum PC mit β -Ala am Carboxyterminus entstehen; und möglicherweise stellte der Satz induzierbarer Peptide mit verzögerten Retentionszeiten aus Phaseolus aureus diese Homologe dar. Den Nachweis, daß die Peptide aus Glycine max, der Sojabohne, tatsächlich β -Ala am Carboxyterminus enthalten, führte E. Grill, damals Doktorand an unserem Lehrstuhl. Er isolierte Schwermetall-bindendes Material aus Cd^{2+} belasteten Sojabohnenkeimlingen, trennte das Isolat über HPLC auf, bestimmte die Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Pepti-

de und fand tatsächlich eine nicht-proteinogene Aminosäure und kein Gly. Er wies durch die von ihm für PC-Peptide ausgearbeiteten Sequenzierungsverfahren nach, daß die Primärstruktur ansonsten der des PC aus R. serpentina entsprach. Die nicht-proteinogene Aminosäure wurde durch Dünnschichtchromatographie und Elektrophorese isoliert. Durch Massenspektroskopie mit direkter chemischer Ionisation (Butan als Stoßgas) wurde im Vergleich mit authentischem β -Ala nachgewiesen, daß es sich um β -Ala handelt. Die Peptide aus G. max wurden in Analogie zum PC **Homophytochelat-in** (im Folgenden mit hPC abgekürzt) genannt (Grill et al, 1986 b) und besitzen die in Abbildung 9 wiedergegebene Strukturformel.

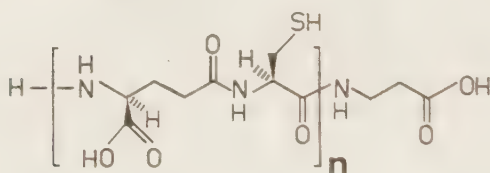


Abbildung 9

Strukturformel der Homo-Phytochelatine, hPC. Indexzahl n (n = 2 - 7) entspricht Anzahl Glu-Cys-Einheiten.

III.2.1 Verbreitung der Homophytochelat-in-Synthese in der Ordnung Fabales

Da einige Mitglieder der Fabales normales GSH (Price 1957) und damit normales PC synthetisieren, während andere ausschließlich hGSH (Price, 1957; Carnegie, 1963; Macnicol und Bergmann, 1984) und damit hPC synthetisieren oder ein gemischtes Bild (L. ochrus) geben, schien es ratsam die Ordnung Fabales in dieser Hinsicht genauer zu analysieren. Dazu diente das für Spermatophyten erarbeitete Verfahren. Tabelle 4 stellt die Daten aus der HPLC-Analyse von Rohextrakten aus Cd²⁺-belasteten Pflanzen zusammen.

Tabelle 4 PC- und hPC-Synthese in Angehörigen der Fabales

Caesalpinieaceae		Tribus									
Art		GSH	hGSH	PC2	hPC2 (nmol/mg TG)	PC3	PC4	PC5	PC6	PC ind.	
<i>Tamarindus indica</i>	Am	0.36		0.03		0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	
<i>Bauhinia purpurea</i> wz.	Ba	1.06		0.17		0.04	0.01	0.00	0.00	0.48	
<i>Caesalpinia sappan</i> wz.	Ca	1.35		0.57		0.26	0.11	0.03	0.01	2.58	
<i>Cassia angustifolia</i> wz.	Cs	2.55		0.91		0.55	0.25	0.04	0.00	4.66	
<i>Cassia marilandica</i> wz.	Cs	1.43		0.43		0.06	0.02	0.00	0.00	1.11	
<i>Ceratonia siliqua</i> bl.	Cs	3.21		0.56		0.00	0.03	0.00	0.00	1.24	
Mimosaceae		Tribus									
Art		GSH	hGSH	PC2	hPC2 (nmol/mg TG)	PC3	PC4	PC5	PC6	PC ind.	
<i>Acacia karroo</i> wz.	Ac	4.11		0.11		0.00	0.00	0.00	0.00	0.21	
<i>Neptunia oleracea</i> wz.	Ad	0.82		0.14		0.01	0.00	0.00	0.00	0.35	
<i>Albizzia lophanta</i> wz.	In	1.70		0.14		0.06	0.04	0.00	0.01	0.68	
<i>Mimosa pudica</i> wz.	Mi	0.67		0.17		0.13	0.06	0.01	0.00	1.03	

Fortsetzung Tabelle 4

Fabaceae Art	Tribus	GSH	HGSH	PC2	hPC2 (nmol/mg TG)	PC3	PC4	PC5	PC6	PC ind.
<i>Coronilla varia</i> *	Co	11.49	2.34	0.66	0.66	0.00	0.00	0.00	0.00	2.65
<i>Desmodium gyrans</i> wz.	Co	1.01		0.19		0.02	0.02	0.00	0.00	0.51
<i>Onobrychis viciifolia</i> S B5	Co	1.69		0.61		0.36	0.27	0.15	0.00	4.14
<i>Onobrychis viciifolia</i> wz.	Co	2.58		0.27		0.11	0.02	0.00	0.00	0.97
<i>Lonchocarpus violaceus</i>	Da	2.61		0.23		0.08	0.01	0.00	0.00	0.71
<i>Pterocarpus officinalis</i> wz.	Da	0.31	1.10	0.04	0.06	0.02	0.00	0.00	0.00	0.25
<i>Astragalus cicer</i> bl.	Ga	0.30	0.26	0.30	0.25	0.24	0.06	0.00	0.00	2.05
<i>Astragalus gummifer</i> wz.	Ga	1.06	0.20	0.20	0.15	0.49	0.13	0.00	0.00	2.67
<i>Astragalus preussii</i> S B5	Ga	2.84		0.72		0.18	0.01	0.00	0.00	2.02
<i>Galega officinalis</i> wz.	Ga		0.83		1.13	0.34	0.00	0.00	0.00	3.28
<i>Glycyrrhiza echinata</i> wz. *	Ga	0.42	0.42	0.20	0.20	0.32	0.15	0.00	0.00	2.36
<i>Robinia pseudacacia</i> bl.	Ga		2.17		1.19	0.16	0.00	0.00	0.00	2.85
<i>Robinia pseudacacia</i> wz.	Ga		0.90		1.09	0.39	0.05	0.00	0.00	3.58
<i>Robinia pseudacacia</i> S LS	Ga		5.64		5.17	0.66	0.13	0.00	0.00	15.86
<i>Crotalaria crassipes</i> wz.	Ge	1.71		0.57		0.35	0.51	0.09	0.00	4.68

Fabaceae		Tribus										
Art		GSH	hGSH	PC2	hPC2 (nmol/mg TG)	PC3	PC4	PC5	PC6	P ⁺ ind.		
<i>Genista tinctoria</i> wz.	Ge	2.02		0.02		0.01	0.01	0.00	0.00	0.09		
<i>Lupinus polyphyllus</i> wz	Ge	1.13		0.33		0.23	0.07	0.00	0.00	1.62		
<i>Anthyllis vulneraria</i> bl.	Lo	0.34	2.48		0.75	0.38	0.09	0.00	0.00	3.02		
<i>Anthyllis vulneraria</i> wz.	Lo		3.43		0.52	0.34	0.11	0.08	0.02	3.05		
<i>Lotus ornatopodioides</i> *	Lo	0.85	0.85	0.13	0.04	0.08	0.04	0.00	0.00	0.70		
<i>Ononis natrix</i> *	On	0.60	0.31	0.07	0.07	0.07	0.00	0.00	0.00	0.48		
<i>Cajanus cajan</i> bl.	Ph		3.12		0.31	0.30	0.02	0.01	0.00	0.74		
<i>Canavalia ensiformis</i> wz. *	Ph	0.68	0.68	0.21	0.21	0.15	0.09	0.00	0.00	1.62		
<i>Canavalia rosea</i> wz.	Ph	1.47		0.37		0.29	0.08	0.00	0.00	1.92		
<i>Clitoria ternatea</i> wz	Ph	1.01		0.49		0.07	0.07	0.00	0.00	1.46		
<i>Dolichos jaquinii</i> bl.*	Ph	0.30	1.45	0.07	0.07	0.05	0.02	0.00	0.00	0.49		
<i>Dolichos jaquinii</i> wz.	Ph		2.51		0.00	0.75	0.63	0.26	0.06	6.41		
<i>Dolichos lablab</i> *	Ph	1.48	1.48	0.08	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.43		
<i>Erythrina coralloides</i> wz.	Ph		1.78		1.24	0.62	0.01	0.00	0.00	4.37		
<i>Erythrina crista-galli</i> wz.	Ph		2.30		0.21	0.03	0.00	0.00	0.00	0.50		
<i>Glycine clandestina</i> bl.	Ph		2.09		0.65	0.19	0.05	0.00	0.00	2.10		

Fortsetzung Tabelle 4

Fabaceae	Tribus	GSH	hGSH	PC2	hPC2 (nmol/mg TG)	PC3	PC4	PC5	PC6	PC ind.
Art										
<i>Glycine hispida</i> bl.	Ph		1.04		0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05
<i>Glycine hispida</i> wz.	Ph		0.91		0.07	0.03	0.02	0.00	0.00	0.31
<i>Glycine max</i> bl.	Ph		0.70		0.03	0.11	0.01	0.00	0.00	0.44
<i>Glycine max</i> S LS	Ph		1.04		0.81	0.09	0.00	0.00	0.00	1.90
<i>Glycine max</i> wz.	Ph		1.00		0.63	0.42	0.02	0.00	0.00	2.60
<i>Phaseolus aureus</i> S LS	Ph		0.90		1.37	0.91	0.52	0.15	0.05	8.61
<i>Phaseolus aureus</i> wz.	Ph		0.46		0.74	0.46	0.16	0.04	0.00	3.70
<i>Phaseolus lunatus</i> wz.	Ph		0.66		0.22	0.11	0.01	0.00	0.00	0.80
<i>Phaseolus multiflorus</i> wz.	Ph		1.24		0.98	0.53	0.08	0.00	0.00	3.84
<i>Phaseolus richardiana</i> wz.	Ph		5.03		0.68	0.32	0.09	0.00	0.00	2.66
<i>Phaseolus vulgaris</i> wz.	Ph		2.88		1.07	0.54	0.07	0.00	0.00	4.04
<i>Rhynchosia phaseoloides</i>	Ph		1.22		0.08	0.01	0.00	0.00	0.00	0.20
<i>Vigna cylindrica</i> wz.	Ph	0.13		0.02		0.01	0.00	0.00	0.00	0.07
<i>Vigna sinensis</i> wz.	Ph	0.57		0.14		0.04	0.01	0.00	0.00	0.45
<i>Vigna umbellata</i>	Ph		1.84		1.12	0.03	0.00	0.00	0.00	2.33
<i>Vigna unguiculata</i> wz.	Ph	1.03		0.18		0.05	0.00	0.00	0.00	0.50

Fabaceae Art	Tribus	GSH	hGSH	PC2	hPC2 (nmol/mg TG)	PC3	PC4	PC5	PC6	PC ind.
<i>Baptisia australis</i> wz.	Po	1.21		0.07		0.07	0.06	0.02	0.02	0.80
<i>Sophora japonica</i> wz.	So	1.48		0.71		0.31	0.06	0.01	0.00	2.66
<i>Sophora viciifolia</i>	So	1.63		0.21		0.04	0.00	0.00	0.00	0.55
<i>Medicago sativa</i>	Tr	1.03	1.54	0.29	0.66	0.31	0.00	0.00	0.00	2.85
<i>Melilotus alba</i> bl.	Tr	0.79	1.33	0.08	0.08	0.06	0.00	0.00	0.00	0.50
<i>Melilotus alba</i> wz. *	Tr	1.20	1.20	1.84	1.84	2.94	0.98	0.12	0.01	20.33
<i>Trifolium incarnatum</i> bl.	Tr	0.92	1.61	0.64	0.64	0.47	0.18	0.02	0.00	4.75
<i>Trifolium pannonicum</i>	Tr	0.12	0.57		0.07	0.03	0.00	0.00	0.00	0.24
<i>Trigonella caerulea</i>	Tr	0.20	0.61	0.02	0.10	0.03	0.00	0.00	0.00	0.32
<i>Trigonella foenum-graecum</i> wz.	Tr	3.63	1.94	0.76	1.06	1.27	0.18	0.00	0.00	8.14
<i>Abrus precatorius</i> bl.	Vi		0.76		0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32
<i>Abrus precatorius</i> wz.	Vi		3.12		0.54	0.04	0.00	0.00	0.00	1.21
<i>Cicer arietinum</i> bl.*	Vi	1.51	0.00	0.31	0.31	0.11	0.02	0.00	0.00	1.65
<i>Cicer arietinum</i> S 4x	Vi	4.77		1.28		0.57	0.06	0.00	0.00	4.51
<i>Cicer arietinum</i> wz	Vi	6.81	0.52	0.32	0.27	0.29	0.06	0.00	0.00	2.27
<i>Lathyrus ochrus</i> wz.	Vi	2.38	0.71	0.56	0.50	0.41	0.04	0.00	0.00	3.50

Fortsetzung Tabelle 4

Fabaceae	Tribus	GSH	hGSH	PC2	hPC2 (nmol/mg TG)	PC3	PC4	PC5	PC6	PC ind.
Art										
Lathyrus odoratus bl.	Vi	0.58	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	.13
Lathyrus odoratus wz. *	Vi	0.72	0.72	0.17	0.12	0.07	0.00	0.00	0.00	.80
Lathyrus silvester *	Vi	0.44	0.44	0.13	0.11	0.15	0.03	0.00	0.00	1.05
Lens culinaris	Vi	1.64	0.73	0.14	0.24	0.11	0.01	0.00	0.00	1.14
Pisum arvense wz.	Vi	2.52	0.59	0.15	0.15	0.06	0.00	0.00	0.00	.77
Pisum sativum wz.	Vi	3.40		1.94		0.80	0.16	0.00	0.00	6.93
Vicia faba wz.	Vi	0.16		0.05		0.04	0.01	0.00	0.00	.27
Vicia villosa wz.	Vi	2.52		0.88		0.21	0.00	0.00	0.00	2.40

Tabelle 4

PC- und hPC-Synthese in Angehörigen der Fabales. Keimlinge wurden für 4 Tage mit $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$, Suspensionskulturen für 3 Tage während der logarithmischen Wachstumsphase mit $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$ belastet. Die PC-/hPC-Induktion (PC ind.; nmol Glu-Cys-Einheiten induziert) gegenüber den Kontrollen, die kein PC enthielten, ist angegeben. Das Auftreten von GSH/hGSH und PC2/hPC2 charakterisiert reine PC- bzw. hPC- oder "gemischte" Pflanzen. Zur Verdeutlichung dieses Unterschieds ist bei Fealen eines dieser Peptide der "Messwert 0" nicht eingetragen. PC3 - PC6 waren von den entsprechenden hPC-Peptiden nicht völlig abgetrennt, die Messwerte auch der hPC-Peptide sind deshalb unter PC3-PC6 eingetragen. Es bedeuten: wz.: Wurzel, bl.: Blatt, S: Suspensionskultur, Medium siehe Kap. II; *: GSH und hGSH nicht vollständig getrennt, Integrationsfläche geteilt.

Spalte Tribus: Ge = Genisteae, Da = Dalbergiaceae, On = Ononideae, Co = Coronilleae, Lo = Loteae, Tr = Trifoliaceae, Vi = Viciaceae, Ga = Galegeae, Ph = Phagnoleae, Po = Podalyriaceae, So = Sophoreae, Mi = Mimosaceae, Ad = Adenanthereae, Mz = Mimosygantheae, Pa = Parkiaceae, In = Ingeae, Ac = Acacieae, Am = Ambristaceae, Di = Dimorphanthereae, Ap = Amphimanthereae, Sw = Swartzeae, Ba = Bauhinieae, Ca = Caesalpinieae und Cs = Cassieae.

Insgesamt wurde PC- bzw. hPC-Synthese in 57 Spezies aus 36 Gattungen aus allen 11 Triben der Fabaceen, 6 Spezies aus 4 Triben der Cesalpiniaceen und 4 Spezies aus 4 Triben der Mimosaceen untersucht. Während alle Mimosaceen, Cesalpinia- ceen sowie alle Angehörigen der Triben Genisteae, Podaly- rieae und Sophoreae nur normales GSH /PC synthetisieren, wurde im Tribus Phaseoleae fast ausschließlich Synthese von hPC festgestellt. Lediglich Clitoria ternatea sowie einige Arten von Vigna synthetisierten GSH/PC. Die Gattung Vigna (deren Einteilung nicht unumstritten ist, Kasai et al. 1986) ist uneinheitlich: Vigna umbellata und die schon besprochene Mungobohne (Vigna radiata (Wilczek) ist identisch mit Pha- seolus aureus (Roxby)) synthetisieren hGSH. In den anderen Triben - Galegeae, Vicieae, Trifolieae, Loteae, Ononideae und Dalbergieae - wurde bis auf wenige Ausnahmen eine Misch- ung aus GSH/hGSH und damit PC/hPC festgestellt. Im Tribus Coronilleae zeigte nur eine von 5 untersuchten Arten das gemischte Bild, die Anderen hatten nur GSH/PC.

In Abbildung 10 sind diese Daten in einer grafischen Dar- stellung in Form eines Stammbaum-Querschnittes durch die Ordnung Fabales dargestellt. Dieser Stammbaumquerschnitt wurde in Anlehnung an die Darstellung des Angiospermensys- tems nach Dahlgren (1980) erstellt. Die Größe der Flächen, die die einzelnen Triben darstellen, entspricht in etwa der Artenzahl, die räumliche Nähe dem Verwandtschaftsgrad. Es wurden Daten aus Frohne und Jensen (1985) sowie Melchior (1964) zugrundegelegt.

III.2.2 Unterschiede im Phytochelatingehalt von Wurzeln und Blättern

Wieder wurden, wie bei den übrigen Spermatophyta, an einigen Pflanzen sowohl Wurzel als auch Blatt beziehungsweise Sproß auf PC- bzw. hPC-Synthese untersucht. Wieder war die Haupt- menge PC in den Wurzeln lokalisiert, in den Blättern war PC oft unter der Nachweisgrenze. In den Pflanzen, in denen auch in den Blättern neben GSH und hGSH ein Gemisch aus PC und

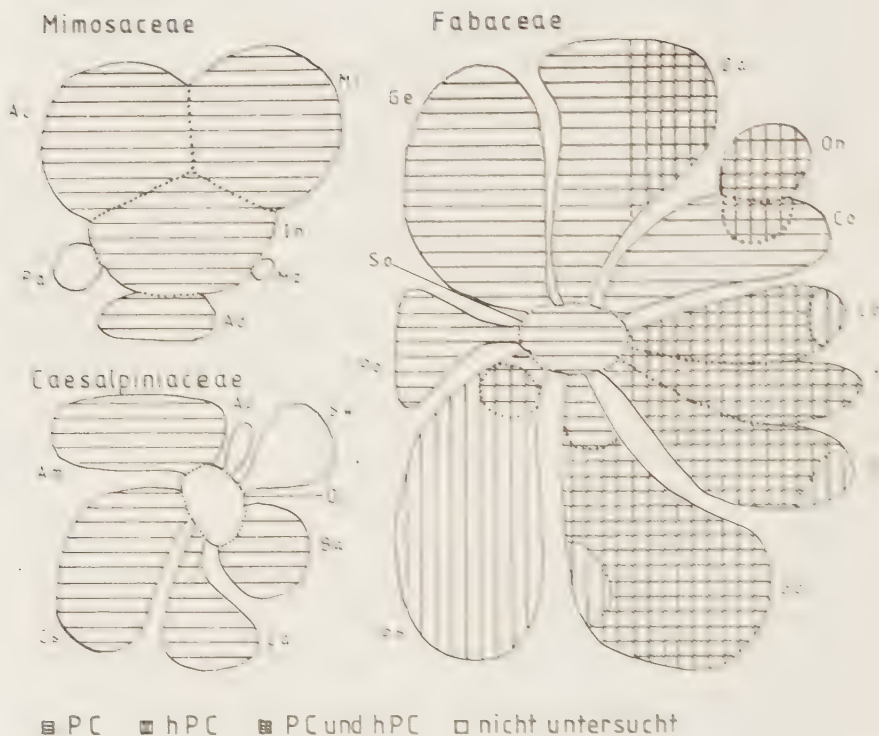


Abbildung 10

Querschnitt durch den Stammbaum der Ordnung Fabales. Die Anordnung der Schraffur bei einzelnen Triben symbolisiert, daß die Gattungen nicht einheitlich PC bzw. hPC bzw. ein Gemisch aus Beiden aufwiesen. Die Triben sind wie folgt bezeichnet: Ge = Genisteae, Da = Dalbergieae, On = Ononideae, Co = Coronilleae, Lo = Lotaeae, Tr = Trifolieae, Vi = Viciaceae, Ga = Galegeae, Ph = Phasoleae, Fo = Fodalyrieae, So = Sophoreae, Mi = Mimosaeae, Ad = Adenanthereae, Mz = Mimozvanteae, Pa = Parkieae, In = Ingeae, Ac = Acacieae, Am = Ambristieae, Di = Dimorphandreeae, Ap = Amprimanthereae, Sw = Swartzieae, Ra = Rastrieae, Ca = Caesalpinieae und Cs = Cassieae.

hPC nachgewiesen werden konnte, zeigte sich, daß nicht nur die Menge der induzierten Peptide viel geringer war als in den Wurzeln, sondern auch mehr zum GSH/PC hin verschoben war. So enthielt zum Beispiel die Kichererbse, Cicer arietinum, ungefähr gleichviel GSH und hGSH/hPC 2 in den Wurzeln, in den Blättern jedoch nur noch GSH und PC. Eine aus denselben Samen angelegte Gewebekultur synthetisierte, ebenso wie eine Suspensionskultur von Astragalus preussii, einen weiteren "Misch"-Peptid, ausschließlich GSH/PC. Antyllis vulneraria enthielt in den Wurzeln nur hGSH/hPC 2, in den Blättern dagegen auch GSH (oder γ -Glutamylcystein) neben hGSH. Die "rein-hPC-Pflanzen" wiesen dagegen auch in den Blättern und in Suspensionskultur ausschließlich hGSH/hPC auf. Die hier erwähnten Pflanzen stellen interessante Aufgaben bezüglich der Regulation der Synthese von GSH bzw. hGSH. Die Verteilung zwischen Beiden könnte durch das Substratangebot und/oder durch die Substratspezifität der Glutathionsynthetase reguliert sein. Diese Fragestellung wurde untersucht, die Ergebnisse hierzu sind in Kap. III.6 dargestellt.

III.2.3 Äquivalenz von Phytochelatin und Homo-Phytochelatin

Um die Äquivalenz von hPC und PC zu belegen, wurde untersucht, ob sich auch hPC durch verschiedenste Metalle induzieren läßt., Grill et al. (1985 b) und Grill (1987) hatten an Suspensionskulturen von R. serpentina und Rosa canina die Induktion von PC-Peptiden durch einen weiten Bereich von Schwermetallsalzen nachgewiesen. Außer Cd^{2+} waren auch andere Schwermetallionen wie Ga^{3+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Au^+ , Cu^{2+} , Sb^{3+} und Ni^{2+} sowie AsO_4^{2-} als Induktor wirksam. Keine Induktion wurde mit Alkali- und Erdalkalimetallen sowie Mangan und Molybdän festgestellt.

Diese Ergebnisse sollten nun durch den Nachweis derselben Induktionswirkung auch für das hPC-System nachvollzogen und durch Untersuchung weiterer Schwermetallsalze bis zur Vollständigkeit ausgebaut werden. Zunächst wurde dazu vom haus-eigenen Gewebekulturlabor eine Gewebekultur von Glycine max

angelegt. Um deren Schwermetall-Toleranz mit der von R. serpentina zu vergleichen, wurden beide Suspensionskulturen mit Cd^{2+} und Pb^{2+} über einen weiten Konzentrationsbereich belastet, das relative Wachstum als Maß für die Toxizität bestimmt und die Induktion von PC bzw. hPC analysiert. Abbildung 11 stellt die Ergebnisse dar, die eine gegenüber R. serpentina geringere Schwermetall-Toleranz der Suspensionskultur von G. max belegen.

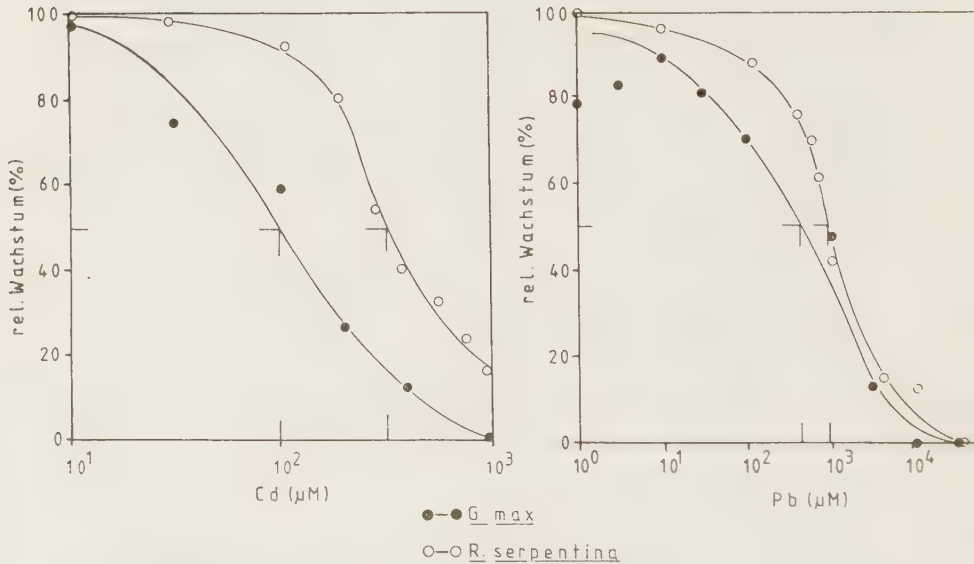


Abbildung 11

Beeinflussung des relativen Wachstums von Glycine max und R. serpentina Suspensionskulturen durch Cd^{2+} (links) und Pb^{2+} (rechts). Die Kontrollkultur von G. max wuchs während der Belastungsdauer von 4 Tagen von 3 gTG/l auf 7,8 gTG/l (Cd) bzw. von 5 gTG/L auf 10,8 gTG/L (Pb) heran. Die von R. serpentina von 4,5 gTG/l auf 9,5 gTG/l (Cd) bzw. 6,5 gTG/L auf 14,5 gTG/l (Pb).

Für 50% Wachstumshemmung reichten 100 (vgl. mit 400) μM Cd^{2+} und 400 (vgl. mit 1000) μM Pb^{2+} aus. Da man mit einer entsprechend höheren Empfindlichkeit von G. max auch gegenüber anderen Schwermetallen rechnen mußte, war es nötig, die an R. serpentina eingesetzten Konzentrationen von Schwermetallen für diese Untersuchung zu verringern. Von den zur Verfügung stehenden Verbindungen der meisten Metalle und einiger Halbmetalle wurden nun mehrere Konzentrationen zur Belastung von Glycine max eingesetzt. Die verwendeten Ionen und der Konzentrationsbereich sind in Abb. 12 in ein Periodensystem eingetragen, ebenso die Induktion oder nicht-Induktion von hPC. Tabelle 5 stellt die diesen Eintragungen zugrundeliegenden Daten zusammen. Es wurde festgestellt, daß im Wesentlichen der selbe Satz von Schwermetall-Ionen als hPC-Induktor wirksam war wie für R. serpentina in den Experimenten von Grill et al. (1985 b) und Grill (1987). Damit ist ein weiteres wichtiges Kriterium für das pflanzliche Schwermetall-Komplexierungssystem auch für das hPC-System erfüllt, die Induzierbarkeit durch wesentlich mehr verschiedene Schwermetalle als für Metallothioneine (die nur von Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} und Zn^{2+} induziert werden). Die Induktionswirkung nimmt dabei in folgender Reihenfolge zu: $\text{Pb}^{2+} < \text{Au}^+ < \text{Zn}^{2+}$ Ag^+ , $\text{In}^{3+} < \text{Sb}^{3+} < \text{Ga}^{3+}$, Cd^{2+} . Diese Reihenfolge ist nicht dieselbe wie sie für R. serpentina ermittelt wurde. Dort waren Pb^{2+} und Zn^{2+} nach Cd^{2+} mit die stärksten PC-Induktoren. Die beiden Suspensionskulturen von R. serpentina und G. max unterscheiden sich also hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber Schwermetallen qualitativ und quantitativ.

Die Kultur von Glycine max war während der ganzen Dauer dieser Experimente sehr empfindlich (frisch angelegt) und zeigte nur Synthese von hPC2 und hPC3, selbst mit den stärksten Induktoren, z. B. Cd^{2+} (siehe Abbildung 13 D). Manche der in R. serpentina eindeutig PC induzierenden Schwermetalle, z. B. Cu^{2+} , Hg^+ , Ni^{2+} , AsO_4^{2-} und SeO_3^- induzierten in G. max nur hPC2 und eine weitere Substanz, die bei einer Retentionszeit von 6 min. eluierte (siehe Pfeile

Periodensystem der Elemente

Ordnungszahl

hPC-Induktion

(●:hPC2; ★:hPC2&hPC3)

Oxidationszahl

★⁺⁸
2 [Cd²⁺]

Konzentrationsbereich

VIIIB

IB

IIIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIIIB

IB

IIIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

VIB

Abbildung 12

Induktion von hPC durch verschiedene Schwermetalle. Eingetragen in ein Periodensystem der Elemente, entnommen aus Mortimer (1973) ist die Ionenform, in der die Elemente den Suspensionskulturen von Glycine max zugefügt wurden, und der Konzentrationsbereich: 1 = 1-50µM, 2 = 50-400 µM, 3 = 100-1000 µM und 4 = 1-10 mM. Zusätzlich wurden eingesetzt: VO₃⁻, CrO₄²⁻, MnO₄⁻, PtCl₆²⁻ und WO₄²⁻.

in Abbildung 13). Diese Substanz wurde auch durch diejenigen Schwermetalle induziert, die hPC2 und hPC3 induzierten (z.B. Cd^{2+} und Yb^{3+} in Abb.13 D und B). In PC-synthetisierenden Kulturen war (selten) ein entsprechender Peak bei 5 min. festgestellt worden. Über die Zusammensetzung dieser Substanz sind nur Spekulationen möglich, es könnte sich um ein Derivat des GSH / hGSH handeln; hier wird nur deswegen darauf eingegangen, weil außer einigen eindeutig PC-induzierenden Schwermetallen auch einige weitere, PC nicht induzierende oder an R. serpentina nicht untersuchte Schwermetalle diese Substanz und hPC2 induzierten. Dazu gehören einige Lanthaniden und Co^{2+} (siehe Abbildung 13 A und B). Kobalt, ein Schwermetall, das bei R. serpentina eindeutig nicht PC-induzierend gewirkt hatte, war zur Induktion von hPC wirksam. In einem Experiment wurden hPC2 und hPC3 durch Co^{2+} induziert, in Wiederholungen nur hPC2 und die bei 6 min. eluierende Substanz. Auch die Induktion durch Fe^{2+} , die in R. serpentina fehlt, wurde wiederholt festgestellt. Tabelle 5 führt die hPC-induzierenden Schwermetalle und die auf das TG bezogene Induktion an Glu-Cys-Einheiten auf. Zur Kontrolle des Bezugs auf das TG sind die Induktionsfaktoren von hPC2 und der bei 6 min. eluierenden Substanz bezogen auf die hGSH-Menge mit angegeben.

Tabelle 5

Induktion von hPC in Glycine max durch verschiedene Schwermetalle. Suspensionskulturen von Glycine max in LS-Medium wurden für 4 Tage während der logarithmischen Wachstumsphase mit SM in den angegebenen Konzentrationen in der aus Abb.12 ersichtlichen Ionenform belastet. Das Wachstum ist in % der Kontrolle angegeben, die während der Versuchsdauer von 4,3 g TG/l auf 9,8 g TG/l heranwuchs. Die hPC-Induktion (hPC ind.; nmol Glu-Cys-Einheiten induziert) ist auf das TG bezogen, die in den letzten beiden Spalten angegebenen Induktionen sind auf den hGSH-Gehalt bezogen. *: Die Bezeichnung "6 min." ist im Text erklärt.

Metall (μM)	Wachst. (%)	6 min.	hPC2 (nmol/mg TG)	hPC3	hPC ind.	6 min.	hPC2 (Induktion/hGSH *)
Ag (200)	10.6	8.0	18.3	0.3	45.3	39.6	370.7
Au (200)	20.9	14.0	6.3	0.8	29.1	62.7	116.5
Bi (120)	30.5	10.3	1.5	0.0	13.3	70.5	41.2
Cd (200)	27.2	14.5	42.9	8.8	126.7	100.1	1217.3
Co (300)	39.8	19.2	2.8	0.1	25.1	204.3	121.7
Cu (100)	77.7	7.4	3.2	0.0	13.7	58.4	101.7
Dy (100)	90.4	1.5	0.6	0.0	2.7	4.4	7.0
Er (100)	81.9	1.0	0.6	0.0	2.3	2.8	7.4
Eu (100)	85.8	1.9	1.2	0.0	4.2	6.3	15.5
Fe (4000)	57.8	15.3	21.9	0.0	59.1	61.5	361.0
Ga (200)	77.1	19.5	31.6	12.8	121.3	142.8	952.1
Gd (100)	86.6	1.8	0.5	0.0	2.8	5.3	6.3
H ₂ SO ₄ (40)	18.3	2.7	13.4	0.0	29.5	7.3	147.6
Hg (10)	94.4	9.1	1.0	0.0	11.0	155.7	66.5
In (1000)	81.5	6.0	17.8	2.7	49.7	236.7	2893.9
Lu (100)	84.4	0.8	0.4	0.0	1.5	3.8	7.7
Mn (2000)	18.1	9.9	4.8	0.0	19.5	35.1	68.9
Nd (100)	58.3	2.1	0.5	0.0	3.2	5.1	5.2
Ni (200)	19.3	21.5	15.8	0.0	53.0	134.4	403.7
Pb (1000)	43.1	10.8	2.1	0.3	15.0	80.9	70.7
Pt (50)	4.3	10.1	0.9	0.0	12.0	98.3	36.6
Sb (200)	23.3	13.7	42.2	0.2	98.7	100.4	1269.4
SeO ₃ (1000)	27.7	0.4	1.5	0.0	3.4	1.8	26.4
Sm (100)	99.3	1.5	0.5	0.0	2.5	4.5	5.5
Sn (400)	44.0	1.2	0.5	0.0	2.2	3.3	5.4
Yb (100)	77.2	12.2	4.0	0.0	20.1	62.5	83.5
Zn (1000)	26.9	11.9	7.4	0.6	28.4	40.1	101.7
Kontrolle	98.6	0.1	0.0	0.0	0.2	1.0	1.0

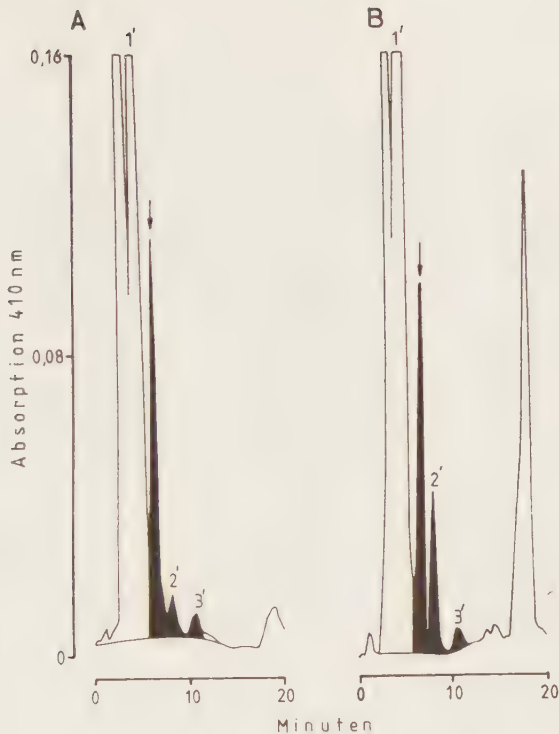


Abbildung 13

HPLC-Analyse mit SH-spezifischer Detektion von Schnellaufschlüssen aus Suspensionskulturen von *Glycine max*, die mit A: $300 \mu\text{M Co}^{2+}$, B: $100 \mu\text{M Yb}^{3+}$ und D: $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$ für 4 Tage während der logarithmischen Wachstumsphase belastet worden waren. C: Chromatogramm der unbelasteten Kontrollkultur. Der Pfeil bezeichnet die bei 6 min. eluierende Substanz (siehe Text). Die Indexzahlen n' geben die Anzahl Glu-Cys-Einheiten in hGSH ($n'=1$) bzw. den hPC-Peptiden an. Die Elutionsbereiche durch Schwermetallbelastung induzierter Peptide sind schwarz ausgefüllt.



III.2.4 Mengenisolation von Homo-Phytochelatin

Um größere Mengen hGSH und hPC isolieren zu können und um mehr und einheitlicheres Gewebe für Enzymisolierungen heranziehen zu können (siehe Kap. III.6), wurden aus Glycine max, Phaseolus aureus, Robinia pseudacacia und Phaseolus vulgaris Suspensionskulturen angelegt. Auch für die Experimente zur Induktion durch verschiedene Metalle und zur Wachstumshemmung mit verschiedenen Metallkonzentrationen war dies unbedingt nötig, da die Keimlinge/differenzierten Pflanzen für solche Reihenversuche nicht einheitlich genug sind und Aufnahme/Ausschlußphänomene die Ergebnisse der Versuche verfälschen können. Dabei erwiesen sich Glycine max, Phaseolus aureus und Robinia pseudacacia als die bestwachsenden Suspensionskulturen, wenngleich sie wesentlich empfindlicher als zum Beispiel R. serpentina waren (Abbildung 11). Außerdem wurden in Sojabohne und Mungobohne hauptsächlich hPC 2 - 4 induziert, nur in einem Fall ließ sich in Mungobohne bis zu hPC 7 nachweisen. In hPC-Isolationen nach der Vorschrift von Grill et al. (1985 a) aus Gewebe, das nur hPC2 - hPC4 enthielt, wurde festgestellt, daß große Verluste an Cd^{2+} und hPC-Peptiden eintraten. Als Ursache dieser Verluste wurde die nach der Ammoniumsulfatfällung nötige Ultrafiltration an der Amicon YM-2 Membran erkannt. Dabei wurde vor allem hGSH und hPC2 im Filtrat gefunden, neben einer der Peptidmenge entsprechenden Menge Cd^{2+} . Die Komplexe aus kürzeren Homologen sind also instabiler als die in R. serpentina typischen Komplexe mit PC2-PC7, manchmal bis PC11 (Grill 1987). Der Ultrafiltrations- und damit der Ammoniumsulfatfällungsschritt mußte deshalb für die Isolation des hPC-Komplexes aus Gewebekulturen umgangen werden. Das Volumen der Ammoniumsulfatfällung war regelmäßig zu groß, um ohne Ultrafiltration durch Gelfiltration weitergereinigt zu werden. Deshalb wurde die Ammoniumsulfatfällung durch eine Fällung mit 50 % Ethanol ersetzt. Diese Methode entfernte die Proteine nicht so weitgehend wie die Fällung mit Ammoniumsulfat. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum bei 40°C und Wieder-

aufnehmen des Rückstands in Säulenpuffer wurde eine durch Ethanol- und Hitzedenaturierung genügend entproteinierte Lösung erhalten, um durch Sephadex G-50-Chromatographie weiter gereinigt zu werden. Dabei wurde zwar das restliche Protein vollends abgetrennt, die hPC-Komplexe aus Gewebekulturen hatten aber ein signifikant kleineres apparentes Molekulargewicht als vergleichbare Komplexe aus R. serpentina oder anderen, bisher verwendeten Pflanzen. Deswegen überlappten die Fraktionen mit SH-Gruppen und Cd^{2+} mit den mit dem Gesamtvolumen eluierenden niedermolekularen Substanzen (Abbildung 14, links). Das Isolat mußte deshalb über Sephadex G-10, mit wesentlich kleinerer Porengröße endgereinigt werden. Dabei konnte eine Abtrennung auch der Salze vom Isolat erreicht werden (Abbildung 14, rechts). Wie Tabelle 6 zeigt, konnte auf diese Weise mit recht guter Ausbeute (66%)

	Protein ^a (mg)	Cd^{2+} (μmol)	SH-Grp. (μmol)	Ausb. Cd^{2+} Anr. (%) (-fach)	
Extrakt	2240	806	2325	100	1
Eluat der DEAE-Chrom.	1935	812	2235	100,7	1,47
Überstand der Ethanol-fällg.	168	745	1552	92,4	15,5
Eluat der G-50 Chrom.	4,2*	684	1399	85	570
Eluat der G-10 Chrom.	3*	533	1363	66	622

Tabelle 6

Reinigung von hPC aus Glycine max, modifiziertes Verfahren. Es wurden 2000 g Suspensionskulturgewebe (148 g TG) eingesetzt. a: Proteinbestimmung (nach Bradford, 1976) *: unter 0,1 mg/ml (Nachweisgrenze). Das gefriergetrocknete Isolat wog nach der Sephadex G-50-Reinigung 2633 mg; nach der Endreinigung 398 mg, davon waren 15% Cd.

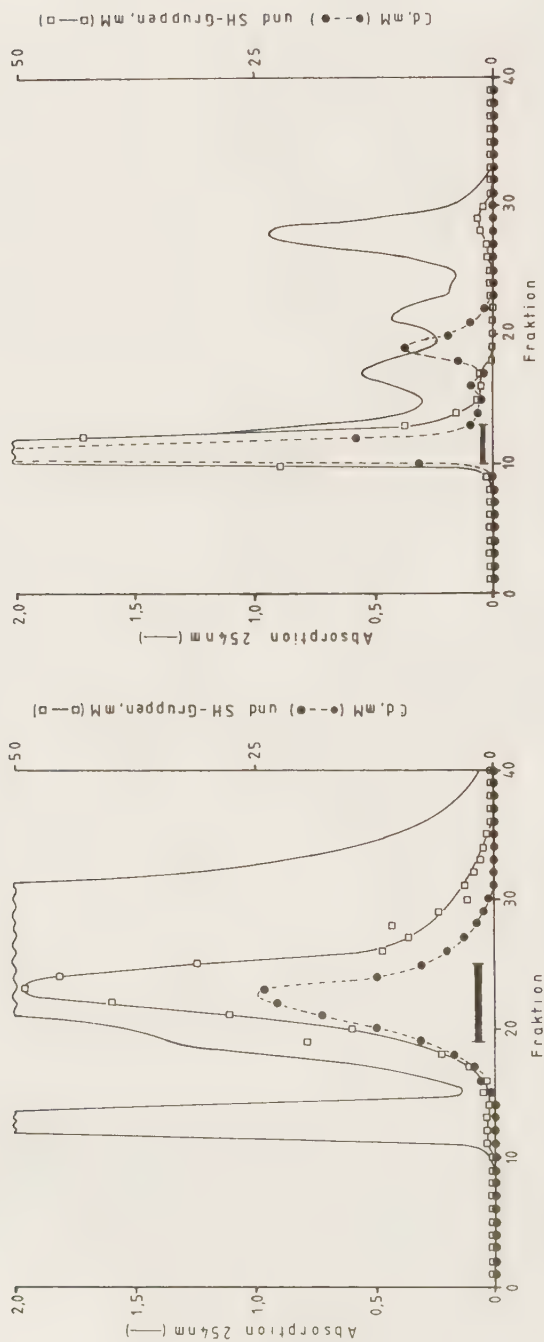


Abbildung 14

Elutionsprofile der Gelchromatographie auf Sephadex G-50 (links) und Sephadex G-10 (rechts) der Präparation von hPC (siehe Tabelle 6). Der Auftrag auf G-50 enthielt 168 mg Protein, 745 $\mu\text{mol Cd}^{2+}$ und 1552 $\mu\text{mol SH-Gruppen}$. Der auf G-10 enthielt 684 $\mu\text{mol Cd}^{2+}$ und 1399 $\mu\text{mol SH-Gruppen}$. Die durch einen Balken ange-deuteten Fraktionen wurden gesammelt und gefriergetrocknet.

ein Komplex isoliert werden, der neben relativ viel hPC2 auch hGSH enthielt (hPC2/hPC3 = 1,5; im Rohextrakt: 8,8). Aus diesem Isolat konnten mit semipräparativer HPLC die einzelnen Peptide präpariert werden. Wie aus Abbildung 15 hervorgeht, war der Komplex mit anderen Peptiden kontaminiert, die sich auf der HPLC fast vollständig abtrennen ließen.

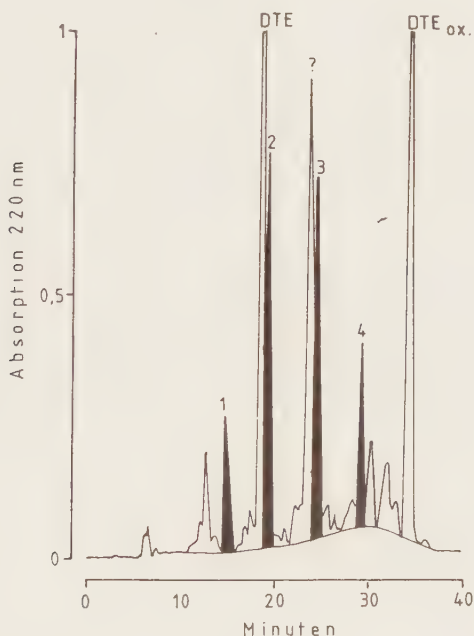


Abbildung 15

Elutionsprofil der HPLC-Präparation der hPC-Peptide aus dem in Abb. 14 (rechts) erhaltenen Material. 100 mg des gefriergetrockneten Komplexes wurden mit 10 mM DTE reduziert und in Laufmittel aufgelöst injiziert. Die schwarz ausgefüllten Bereiche entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt und gefriergetrocknet. Die Indexzahl n entspricht der Anzahl Glu-Cys-Einheiten in den hPC-Peptiden.

III.3: Phytochelatinsynthese in weiteren Abteilungen des Pflanzenreichs

III.3.1 Phytochelatinsynthese in Angehörigen der Sporophyta

Nachdem die Fähigkeit zur PC-Synthese in allen permatophyta nachgewiesen war, lag die Vermutung nahe, daß auch andere grüne Pflanzen Schwermetalle mit diesem System komplexieren und entgiften. Deshalb wurden Versuche unternommen, schwermetallinduzierte Synthese von PC auch in den Sporophyta nachzuweisen. Das für Spermatophyten ausgearbeitete System der Kultivierung und Belastung von Keimlingen in Hydrokultur war für Sporophyten nicht anzuwenden. Deshalb wurden, wie schon in den Vorversuchen zur Analyse der Spermatophyten, zunächst Pflanzen untersucht, die an einen aquatischen Lebensraum adaptiert sind. Zwei Wasserfarne (Azolla filiculoides und Marsilea quadrifolia) konnten in Erde submers bzw. frei schwimmend in Nährsalzlösung kultiviert werden und zeigten nach Belastung mit Cd^{2+} PC-Synthese. Landbewohnende Vertreter der Sporophyta, Arten von Marchantia, Selaginella, Equisetum und Lycopodium konnten nicht entsprechend den Keimlingen von Gymnospermen zur PC-Synthese induziert werden. Im Gegensatz zu diesen war für die von Erde befreiten Rhizome das Cd^{2+} offensichtlich nicht in ausreichender Menge verfügbar, oder Transport oder Aufnahme ins Zellinnere waren verhindert. Wenn die Rhizome durch das Ausgraben und Waschen sowie die nachfolgende Hydrokultur geschädigt worden waren oder die Pflanzen in diesem künstlichen System den Zellstoffwechsel verlangsamten oder umsteuern, sollte mit Belastung der Pflanzen im natürlichen Substrat ein besseres Ergebnis erzielt werden. In Schnellaufschlüssen aus Pflanzen, die mit $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$ im Gießwasser belastet worden waren, während sie in Erde wuchsen und deutlich sichtbar Zuwachs zeigten, wurde kein PC gefunden. Diese Proben enthielten aber 2 - 20 $\mu\text{g Cd}$ (AAS), was etwa 15 - 120 $\mu\text{g PC-Komplex}$ entsprechen würde. Diese Menge PC hätte in der HPLC-Analyse nicht übersehen werden können. Wenn das Cadmium in den

Rohextrakten nicht in PC komplexiert war, konnte es an andere spezifische Liganden, an Fruchtsäuren in der Vakuole oder in Zellwand-Material fixiert sein. Aus ionischen Bindungen an Fruchtsäuren, Zellwandmaterial oder Proteine setzt der denaturierende, saure Schnellaufschluß Cd^{2+} frei. Eine überwiegende Bindung an Proteine über ca. 3000 Da konnte mit Gelfiltration an Sephadex G-50 ausgeschlossen werden. Das Cd aus Rohextrakten (in neutralem pH, mit Mercaptoethanol als Oxidationsschutz) von Marchantia polymorpha, Physcomitrella patens (zwei Moosen) und Polystichum setiferum (Borstiger Schildfarn) eluierte mit dem Gesamtvolumen, als "freies" Cd. Nur ca. 5% des im Gewebe mit AAS meßbaren Cadmiumgehalts wurde in diesen Rohextrakten gefunden, der Rest war also in den Zellwänden, anhängendem Material und unaufgeschlossenen Zellen zu suchen. Das Cd^{2+} war für die Rhizome also nicht verfügbar gewesen, eine Aufnahme in die Zellen hatte nur in sehr geringem Umfang stattgefunden. Wie könnte man aber die Verfügbarkeit von Cd^{2+} im Boden erhöhen? Nach Fischer (1987) werden an Huminstoffe und andere Ionenaustauschergruppen des Bodens gebundene 1- und 2-wertige Metallionen nicht nur durch sauren pH, sondern auch z. B. durch Al^{3+} verfügbar gemacht (Fischer (1987)). Deshalb wurde die Belastung mit Cd^{2+} mit gleichzeitiger Gabe von Al^{3+} wiederholt. Tatsächlich wurde in einigen Vertretern von Sporophyten (Arten von Equisetum und Marchantia) im natürlichen Substrat, die mit 100 μM Cd^{2+} und 1 mM Al^{3+} gegossen worden waren, eine Induktion von PC festgestellt. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß Frohne und Jensen (1985) als Charakteristikum der Lycopodiatae deren Akkumulation von Al^{3+} in der Vakuole erwähnen. Al^{3+} ohne Cd^{2+} gegeben würde im Substrat vorhandene Schwermetalle freisetzen, induzierte aber kein PC in den Sporophyten. Mit Cd^{2+} allein, auch bei längerer Belastungsdauer, wurde nur geringe PC-Induktion in einzelnen Versuchen festgestellt. Mit den Sporophyten im jeweiligen Belastungssystem mitinkubierte Keimlinge höherer Pflanzen (Linum usitatissimum) zeigten jeweils, daß die angewandte Methode in Spermatophyten zu sehr viel höherer PC-Induktion

führte als sie in den niederen Pflanzen feststellbar war. Die Keimlinge von L. usitatissimum zeigten auch eine geringe PC-Synthese, wenn nur mit Al^{3+} behandelt worden war: das Verfügbarmachen der geringen, im Boden vorhandenen Schwermetall-Mengen reichte hier zur PC-Induktion aus. Abbildung 16 zeigt die HPLC-Elutionsprofile von Analysen einiger Sporophyten.

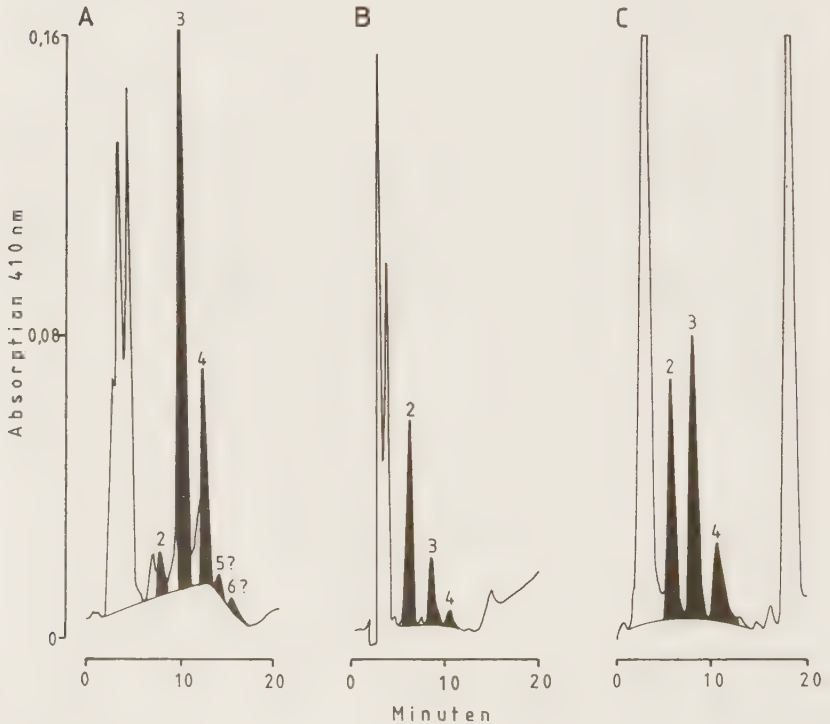


Abbildung 16

HPLC-Analysen mit SH-spezifischer Detektion von Schnellaufschlüssen aus Angehörigen der Sporophyta. A: Selaginella viticulosa mit Al^{3+} und Cd^{2+} im Gießwasser belastet, B: Marchantia polymorpha auf Agarmedium mit Zn^{2+} belastet und C: Suspensionskultur von Equisetum giganteum mit Cd^{2+} belastet (Konzentrationen siehe Tabelle 7).

Art	Ordnung	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC ind.
		(nmol/mg TG)					
<i>Marchantia polymorpha</i>	Marchantiales	0.5	0.2	0.0	0.0	0.0	1.7
<i>Selaginella viticulosa</i> *	Selaginellales	0.2	0.1	0.1	0.0	0.0	0.9
<i>Lycopodium clavatum</i> *	Lycopodiales	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
<i>Equisetum giganteum</i> +	Equisetales	0.4	0.3	0.1	0.0	0.0	1.9
<i>Equisetum giganteum</i> *	Equisetales	0.0	0.5	0.2	0.0	0.0	2.5
<i>Equisetum giganteum</i> S	Equisetales	0.5	0.2	0.2	0.1	0.1	3.3
<i>Azolla filiculoides</i>	Hydropteridales	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.7
<i>Marsilea quadrifolia</i>	Hydropteridales	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
Kontrolle: <i>Lin. usit.</i> *	Geraniales	0.0	2.3	0.6	0.3	0.5	13.7

Tabelle 7

PC-Synthese in Angehörigen der Sporophyta. Azolla und Marsilea wurden in 1/10 Medium H, Marchantia auf Agarmedium W und Selaginella, Equisetum und Lycopodium im natürlichen Substrat mit 100 μM Cd^{2+} für 4 - 10 Tage belastet. *: 1 mM Al^{3+} , 1 mM Zn^{2+} und 100 μM Cd^{2+} im Gießwasser; +: nur 100 μM Cd^{2+} ; S: Suspensionskultur in DAX, 4 Tage während der logarithmischen Phase mit 100 μM Cd^{2+} belastet. Unbelastete Kontrollen enthielten kein PC. Die Molmengen PC-Peptide und die PC-Induktion (PC ind.; nmol Glu-Cys-Einheiten induziert) sind auf mg Protein bezogen. Als positive Kontrolle dienten Keimlinge von Linum usitatissimum aus 5 Tage vor Belastung in die Erde gebrachten Samen.

Tabelle 7 stellt die Daten über PC-Synthese in Sporophyten zusammen. Deutlich wird aus der in der letzten Spalte angegebenen PC-Induktion der Unterschied zwischen Sporophyten und den als positive Kontrolle verwendeten Keimlingen aus Leinsamen. Offensichtlich gibt es in Bezug auf Schwermetallaufnahme grundsätzliche Unterschiede zwischen Spermatophyta und Sporophyta.

Gewebekulturen, die - wie für höhere Pflanzen ausgeführt - experimentell schwer zugängliche Boden- und Aufnahmeeffekte umgangen hätten, standen zunächst nicht zur Verfügung. Von Frh. B. Rittgen wurde im hauseigenen Gewebekulturlabor eine

Suspensionskultur von Equisetum giganteum angelegt. Dies muß als Pionierleistung besonders gewürdigt werden, denn diese Aufgabe ist, verglichen mit dem Anlegen von Gewebekulturen aus Samen, ungleich schwieriger. Die Gewebeteile waren nur durch sorgfältiges Standardisieren der Sterilisierungsbedingungen axenisch und gleichzeitig vital zu erhalten. Nur die große Vielzahl von durchprobierten Medien erlaubte es schließlich, das Gewebe in dedifferenziertem Zustand wachsen zu lassen. Diese Kultur zeigte durchschnittliche Werte der PC-Induktion nach Belastung mit Cd^{2+} ohne Zugabe weiterer Substanzen.

Besondere Schwierigkeiten bereitete es, im langsam wachsenden Bärlapp Lycopodium clavatum und in verschiedenen untersuchten Moosen PC-Induktion nachzuweisen. Neben Marchantia polymorpha (und einem nicht näher bestimmten, wildgewachsenen Lebermoos) das in vitro auf Agarmedien, aber in differenziertem Zustand gehalten wurde, wurden auch Kulturen von Funaria hygrometrica und Physcomitrella patens (zwei Laubmoosen) in Submerskultur oder auf Agarnährböden untersucht. Nur in der Kultur auf Agarböden mit Medium W ließ sich M. polymorpha zur PC-Synthese induzieren, außerdem war nur Zn^{2+} , nicht Cd^{2+} wirksam. Das Freiwaschen der Rhizome von Agar, das nicht restlos gelang, war eine weitere Schwierigkeit, die zu verglichen mit anderen Pflanzen verdünnten Proben führte.

III.3.2 Phytochelatin in Algen

Ist die Fähigkeit zur PC-Synthese in allen Organismen des Pflanzenreiches entwickelt? Dies ist sicher eine zu früh gestellte Frage. Die bisher dargestellten Daten rechtfertigen jedoch die Vermutung, die Pflanzen der Abteilung Phyco-phyta, die Algen könnten ebenfalls diese Fähigkeit besitzen. Der Schwermetall-Komplexierungsmechanismus in Algen ist von besonderem Interesse, weil Algen Schwermetalle mehrere Größenordnungen gegenüber dem umgebenden Medium anreichern

können (Becker, 1986). Algen können dazu herangezogen werden, Schwermetall-vergiftetes Wasser zu reinigen, ja sogar wertvolle Metalle anzureichern oder wiederzugewinnen (siehe Literaturzitate in Kessler, 1986). Andererseits wird die Massenkultur von Algen als Nahrungsgrundstoff wegen des Proteinreichtums dieser Mikroorganismen in Zukunft an Bedeutung gewinnen (Becker, 1986). Sind für die Komplexierung von Schwermetallen in Algen nun MT-ähnliche Proteine oder PC verantwortlich?

Es liegen mehrere Berichte über schwermetallbindende Proteine in Algen vor (Stokes et al. 1977, Hart und Bertram 1980, Nagano et al. 1982, 1984, Gingrich et al. 1986, Weber et al. 1987). Wie in der Literatur über Schwermetall-bindende Proteine einiger Samenpflanzen stimmen manche der Eigenschaften dieser Proteine mit denen von Metallothionein überein (Absorption bei 254 nm, SH - Reichtum). Die aus Algen isolierten Komplexe unterscheiden sich aber in anderen Eigenschaften von den MT-Proteinen. Die höhere Acidität und die höhere Labilität des Komplexes, auch die fehlende Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen MT (Gingrich et al., 1986) sind Charakteristika, die sich auch mit Phytochelatin-komplexen vereinbaren lassen.

III.3.3 Isolierung des Schwermetall-bindenden Materials aus Chlorella fusca

Wie es für Schwermetall-bindende Komplexe aus Tomaten und Rotkohl durchgeführt worden war (Grill 1987), sollte deshalb das Schwermetall-bindende Material nach Literaturvorschriften isoliert und mit den von Grill et al. (1985 a) und Grill (1987) ausgearbeiteten Methoden analysiert werden. Wegen der relativ einfachen Kultivierung und der berichteten Metalltoleranz (Kessler, 1986) wurde für die ersten Experimente zur Untersuchung dieser Frage die Alge Chlorella fusca ausgewählt. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen zwei Tage lang kultiviert, um dann für weitere zwei Tage mit 20 μM Cd^{2+} belastet zu werden. Aus diesen Algen sowie einer

Kontrollkultur wurden Rohextrakte erhalten und auf Sephadex G-50 chromatographiert, um die induzierte Synthese einer Substanz vom M_r 2-10 kDa (Nagano et al., 1982, 1984, Grill et al., 1985a) erkennen zu können. Das Ergebnis zeigt Abbildung 17: in einem Bereich, der dem erwarteten Molekulargewicht entspricht, eluierte eine induzierbare, sowohl SH- als auch Cd^{2+} -haltige Substanz. Mehr als 65 % des im Rohextrakt vorhandenen Cd^{2+} und SH-Gruppen waren in dieser Substanz komplexiert. In der Kontrolle, der bei der Aufarbeitung eine entsprechende Menge Cd^{2+} zugesetzt worden war, wurden 25% des Cd^{2+} an hochmolekularem proteinartigem Material gebunden und 65 % eluierten als freies Cd^{2+} . Diese Elutionsprofile geben eine Situation wieder, wie sie auch von Grill et al. (1985 a) an Suspensionskulturen höherer Pflanzen beschrieben worden war.

Um für die Strukturaufklärung des Schwermetall-bindenden Materials genügend reine Substanz zu erhalten, wurde der Komplex aus 42 g (Frischgewicht) mit 20 μM Cd^{2+} belasteter C. fusca Zellen genau nach der von Grill et al. (1985 a) und Grill (1987) ausgearbeiteten Vorschrift isoliert. Abbildung 18 zeigt das Elutionsprofil der Gelfiltration des Überstandes der 80 % Ammonsulfatfällung. Deutlich sind die Abtrennung letzter Spuren von Protein und geringer Mengen freien Cadmiums zu erkennen. Das intermediär eluierende Material (Fraktionen 12-19) wurde gesammelt und gefriergetrocknet. Aus der Reinigungstabelle (Tabelle 8) geht hervor, daß das Isolat (32 mg) ca. 27 % des Cd^{2+} im Rohextrakt enthielt und auf Cd^{2+} bezogen mehr als 300-fach angereichert war. Diesem Faktor liegt eine nach der Nachweisgrenze der Proteinbestimmung geschätzte Obergrenze kontaminierender Proteine (die nicht mehr nachgewiesen werden konnten) zugrunde. Die SH-Bestimmung entspricht rechnerisch 15,8 mg PC-Peptiden, 26,7 μmol Cd entsprechen 3mg Substanz. Die restlichen 8 mg sind vermutlich Puffersalze aus der Gelchromatographie. Eine Nachreinigung auf Sephadex G-10 ergab 5 mg salzfreies Isolat.

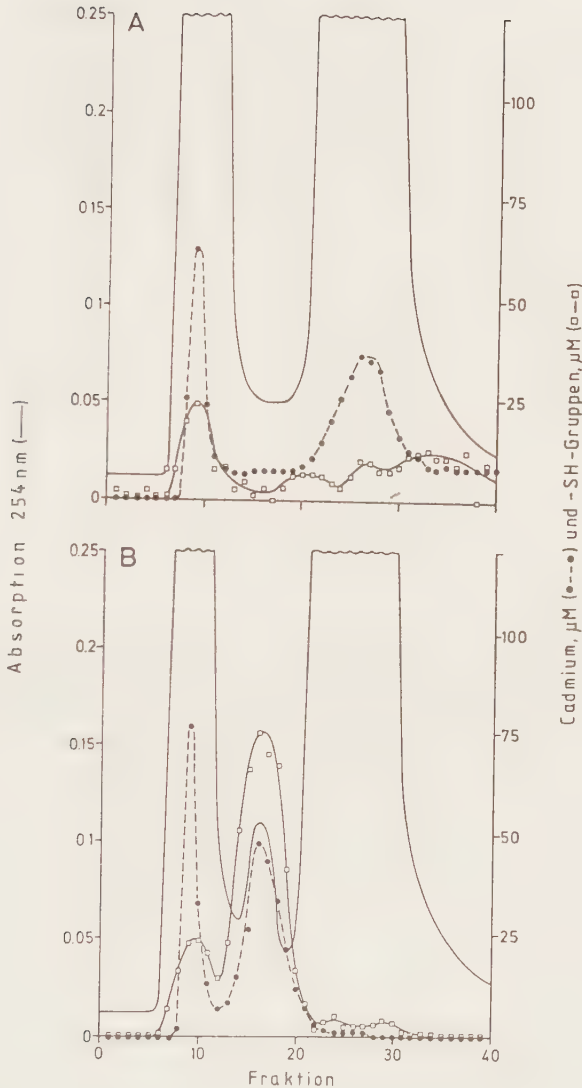


Abbildung 17

Elutionsprofile der Gelchromatographie auf Sephadex G-50 von Rohextrakten aus unbelasteter (A) und belasteter (B) *Chlorella fusca*.

A: Dem Rohextrakt aus 10 g (FG) Zellen (290 mg Protein) wurde nach dem Homogenisieren 3 μmol Cd^{2+} zugesetzt.

B: Der Rohextrakt aus *C. fusca*, die für 2 Tage während der logarithmischen Wachstumsphase mit 20 μM Cd^{2+} belastet worden war, enthielt 265 mg Protein, 3,4 μmol Cd^{2+} und 7,2 μmol SH.

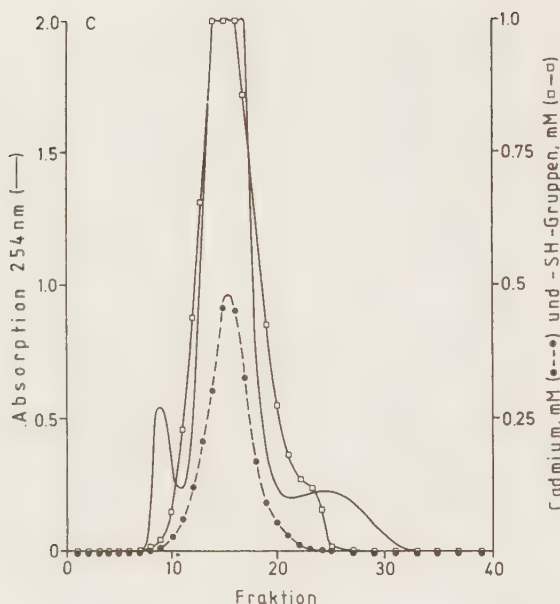


Abbildung 18

Elutionsprofil der Gelchromatographie auf Sephadex G-50 der Präparation des SM-bindenden Materials aus *C. fusca*. Aufgetragen wurde das Retentat aus 42 g (FG) Zellen von Cd^{2+} -belasteter *Chlorella fusca* nach DEAE-Chromatographie, Ammonsulfatfällung und Ultrafiltration. Die Lösung enthielt 15 mg Protein, 31,5 μmol Cd^{2+} und 84,7 μmol SH. Fraktionen 12 bis 19 wurden vereinigt (50 ml) und gefriergetrocknet.

	Protein ^a (mg)	Cd^{2+} (μmol)	SH-Grp. (μmol)	Ausb. Cd^{2+} Anr. (%)	(-fach)
Extrakt	5750	97,5	643,1	100	1
Eluat der DEAE-Chrom.	3534	50,72	206,6	52,02	0,84
Überstand der Ammonsulfatfällung	15	31,5	84,7	32,3	124
Eluat der G-50 Chrom.	5 ^b	26,7	63,3	27,4	314

Tabelle 8

Reinigung des SM-bindenden Materials aus *Chlorella fusca*. a: Proteinbestimmung nach Bradford (1976). b: Protein unter der Nachweisgrenze von 0,1 mg/ml, also maximal 5 mg Protein in 50 ml. Das gefriergetrocknete Isolat wog 32 mg.

III.3.4 Sequenzierung von Phytochelatin aus Chlorella fusca

Von dem Isolat aus C. fusca wurden 4 mg durch HPLC aufgetrennt (Abbildung 19), die einzelnen Peptide aufgefangen und zur Trockene eingengt. Die Menge der Peptide 2, 3 und 4 wurde in drei aliquote Teile aufgeteilt.

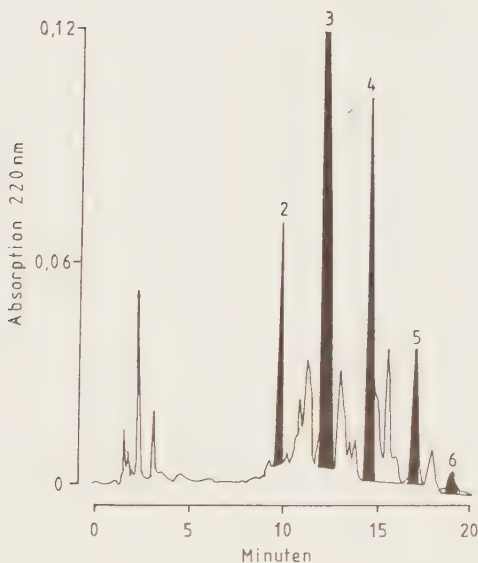


Abbildung 19

Elutionsprofil der HPLC-Präparation aus 4 mg SM-bindenden Materials aus Chlorella fusca. Die Indexzahlen n bezeichnen die Anzahl von Glu-Cys-Einheiten in PC-Peptiden aus R. serpentina, die zu den entsprechenden Zeiten mit einem gleichen Gradienten (0-20 % Acetonitril linear) eluiert wurden. Die den ausgefüllten Flächen entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt und zur Trockene eingengt. Das Chromatogramm wurde um die Absorption eines Leergradienten (Ansteigende Grundlinie wegen Absorption des Acetonitrils) korrigiert.

Ein Aliquot wurde mit Perameisensäure oxidiert und mit 6 N HCl totalhydrolysiert. Tabelle 9 zeigt die Daten der Aminosäureanalyse dieser Peptide. Es wurden, bezogen auf eine Kettenlänge von 5 bzw. 7 und 9 Aminosäuren, je 2 bzw. 3 und 4 Reste Glu und Cys, sowie jeweils ein Gly gefunden. Die Zahlen stimmen mit den aus der Struktur von PC 2 - 4 zu erwartenden Verhältnissen überein.

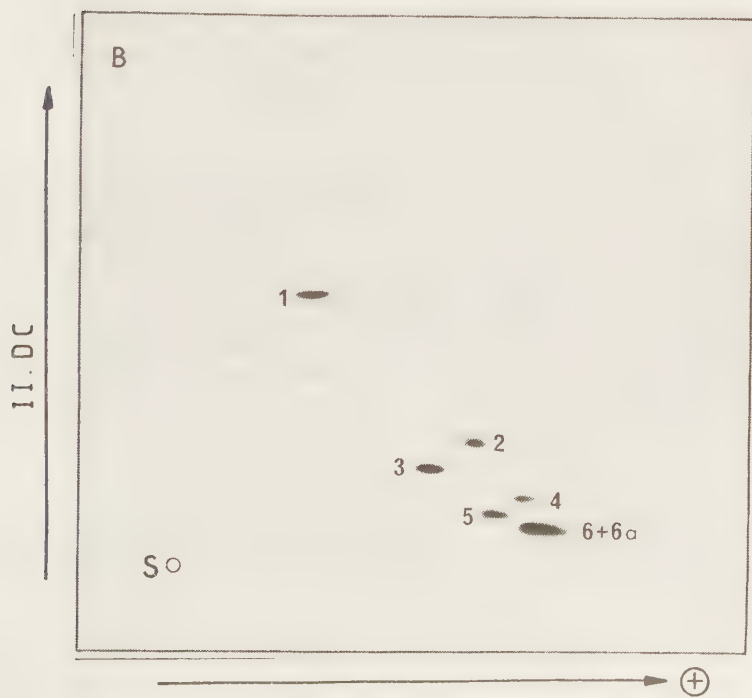
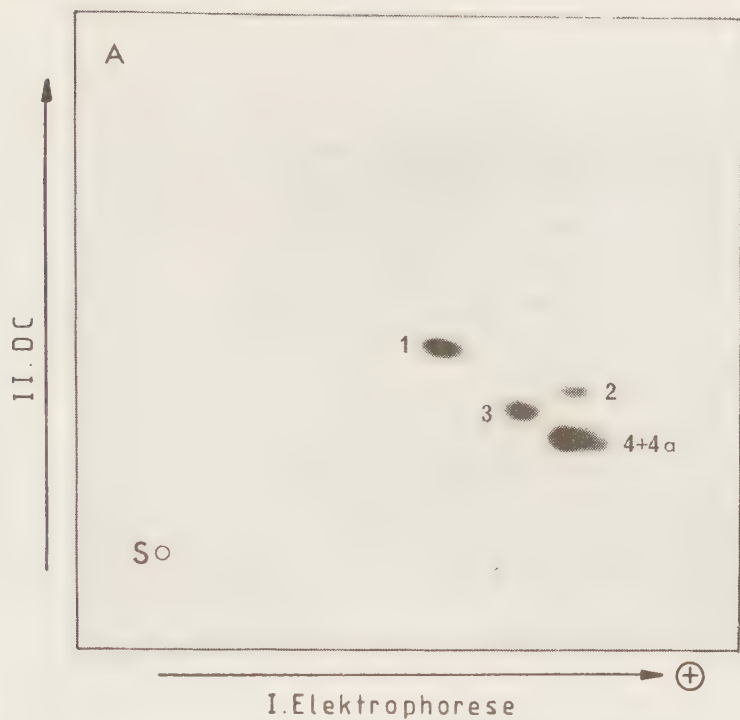
	in Molprozenten			bezogen auf Kettenlänge		
	PC2	PC3	PC4	PC2	PC3	PC4
Glu	40,9	43,1	46,6	2,05	3,02	4,19
Cys	38,6	42,8	43,7	1,93	2,97	3,90
Gly	20,5	14,1	10,1	1,03	0,99	0,91

Tabelle 9

Aminosäurezusammensetzung von Peptiden 2, 3 und 4 aus Chlorella fusca SM-bindendem Komplex (siehe Abb. 19). Cys wurde als Sulfonsäure bestimmt, Glu bedeutet die Summe aus Glu und möglicherweise desamidiertem Gln.

Zur Sequenzierung wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Grill die Peptide mit γ -Glutamyltransferase behandelt (1 mol Glu / mol Peptid wurde freigesetzt), danach schloß sich ein modifizierter Edman-Abbau an, der als nächste Aminosäure Cys ergab. Wiederholte Anwendung dieser beiden Schritte setzte jeweils abwechselnd einen (γ -)Glutamyl- und einen Cysteinylrest frei. Damit waren die γ -Glutamylbindungen des PC und der alternierende Aufbau aus Glu und Cys bewiesen.

Die Identität der Peptide mit den PC-Monomeren mußte durch eine weitere, unabhängige Methode zweifelsfrei nachgewiesen werden. Zur Sequenzierung mit der von Grill (1987) ausgearbeiteten "fingerprint" -Methode wurden die Peptide perameisensäureoxidiert, am Aminoterminus dinitrophenyliert und, nach Partialhydrolyse, in zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Abbildung 20 zeigt das Ergebnis:



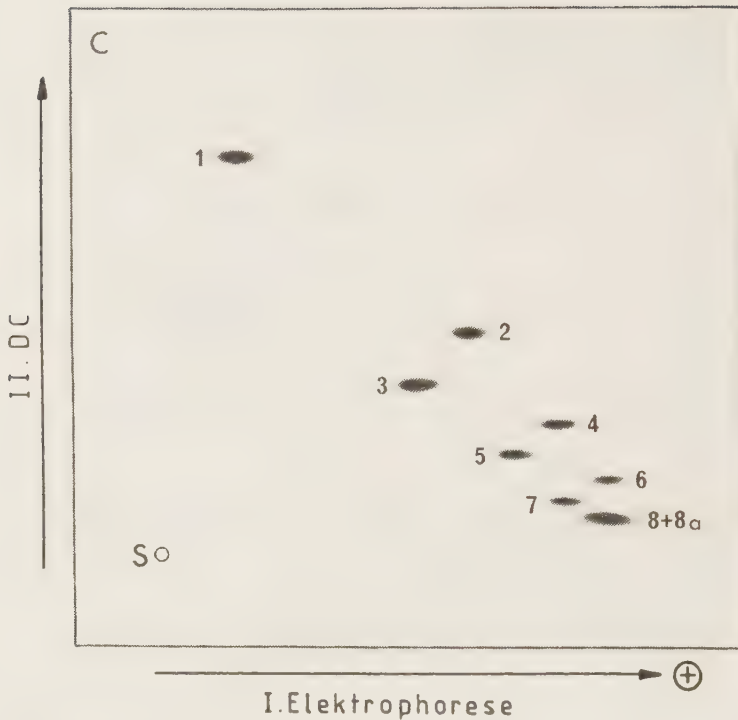


Abbildung 20

2-Dimensionale Dünnschichtchromatographie von perameisensäureoxidierten, dinitrophenylierten und partialhydrolysierten Peptiden aus *Chlorrella fusca*. Derivat aus ca. 20 µg der Peptide (siehe Abb. 18) $n = 2$ (A), 3 (B) und 4 (C) wurde jeweils bei S aufgetragen. Nach der Trennung durch I. Elektrophorese und II. DC wurden die gelben Flecken unter UV - Licht (360 nm) fotografiert. Die Substanzen wurden eluiert und die Aminosäurezusammensetzung bestimmt: 1: DNP-Glu, 2: DNP-Glu-Cys (DNP-GC), 3: DNP-GC-Glu, 4: DNP-(GC)₂, 5: DNP-(GC)₂-Glu, 6: DNP-(GC)₃, 7: DNP-(GC)₃-Glu, 8: DNP-(GC)₄, 4a: DNP-(GC)₂-Gly, 6a: DNP-(GC)₃-Gly, 8a: DNP-(GC)₄-Gly.

es wurden die bereits von PC aus höheren Pflanzen her bekannten charakteristischen Bilder erhalten (Grill 1987). Die zwei Serien von Peptiden mit intaktem Aminoterminus, nämlich solche mit Glu am Carboxyterminus (Fragmente 3, 5, ...) waren deutlich von denen mit einem Carboxyterminalen Cys (Fragmente 2, 4, ...) getrennt. Das ungespaltene Peptid wurde, wie bei PC aus höheren Pflanzen, nicht völlig vom um eine Aminosäure verkürzten Fragment abgetrennt. Die einzelnen Fragmente wurden eluiert, die Absorption der DNP - Gruppe bei 360 nm bestimmt und die Peptide totalhydrolysiert. Die Aminosäureanalyse der Fragmente aus dem Chromatogramm in Ab. 20 C stellt Tabelle 10 dar. DNP-Glu wird in der Ninhydrin-Reaktion zur Detektion der Aminosäuren nach HPLC nicht erfaßt, es wurde gesondert durch Dünnschichtchromatographie bestimmt. Wie erwartet, wurde die bereits von PC bekannte Sequenz ermittelt.

Damit war mit zwei unabhängigen Methoden, nämlich enzymatisch-chemischer Sequenzierung und "fingerprint"-Sequenzierung nachgewiesen, daß das Schwermetall-bindende Material aus C. fusca identisch mit PC aus höheren Pflanzen ist.

III.3.5 Sulfid in Phytochelatinkomplexen

Um die Identität des PC-Komplexes aus C. fusca mit dem von anderen Autoren isolierten Schwermetall-komplexierenden Material zu untersuchen, wurde Berichten über das Auftreten von freiem Sulfid in diesen Komplexen nachgegangen. Weber et al. (1987) stellten freies Sulfid in dem aus Euglena gracilis isolierten Komplex Cd^{2+} -Bp²⁺II fest. Murasugi et al. (1983) sowie Hayashi et al. (1986) berichteten über freies Sulfid in den Cd^{2+} -bindenden Peptidkomplexen aus Schizosaccharomyces pombe. Die nicht vollständige Restaurierbarkeit der Absorption bei 254 nm nach Ansäuern und wieder Neutralisierung des Komplexes, die Weber et al. (1987) auf das Auftreten des Sulfids hingewiesen hatte, konnte auch auf Luftoxidation der SH-Gruppen beruhen. Es war ferner zu erwarten, daß die aus den kleinen Mengen des aus C. fusca isolierten Komplexes

Bruchstück	A ₃₆₀	nmol/0,05 A ₃₆₀			Molverhältnis			Sequenz
		Glu	Cys	Gly	Glu	Cys	Gly	
1	0,17	0	0	0	0	0	0	(Glu)
2	0,073	0	4,66	0	0	1	0	(Glu)-Cys
3	0,095	4,44	4,39	0	1	1	0	(GC)-Glu
4	0,036	4,17	8,05	0	1	2	0	(GC) ₂
5	0,059	8,44	8,89	0	2	2	0	(GC) ₂ -Glu
6	0,017	8,09	12,91	0	2	3	0	(GC) ₃
7	0,028	11,83	13,86	0	3	3	0	(GC) ₃ -Glu
8+8a	0,079	12,33	17,08	1,72	3	4	0,4	(GC) ₄ +(GC) ₄ -Gly

Tabelle 10

Aminosäurezusammensetzung der Peptide aus der 2-dimensionalen DC aus Abbildung 20. C. Glu ist die Summe aus Glu und möglicherweise desamidiertem Gln, Cys wurde als Sulfonsäure bestimmt. Das aminoterminal DNP-Glu wurde durch DC-Vergleich mit DNP-Aminosäuren bestimmt.

eventuell ausgefällten geringen Mengen Cadmiumsulfids nicht zur Quantifizierung ausreichen. Die von Hayashi et al. (1986) und Weber et al. (1987) zur Quantifizierung des Sulfids eingesetzte Messung mit Methylenblau ist ebenfalls schwierig zu quantifizieren, was bei kleinen zu erwartenden Signalen besonders ins Gewicht fällt. Um das Sulfid im Augenblick des Freiwerdens aus dem Komplex als Derivat abzufangen, wurde die Methode von Newton et al. (1981) zum zweifelsfreien Nachweis freien Sulfids gewählt.

SH-haltige Moleküle wurden mit Monobrombiman derivatisiert, einem spezifisch mit SH-Gruppen reagierenden Fluoreszenzreagens. Die Derivate aus Thiolpeptiden lassen sich gut vom freien Reagens und vom Derivat mit H₂S abtrennen. Die mit automatischer Integration bestimmte Peakfläche nach Analyse der Reaktionsprodukte mit HPLC und Detektion bei 368 nm, dem Absorptionsmaximum der Derivate, diente als Maß für die

Menge an Derivat. Die Detektion wurde mit Verdünnungsreihen aus einer H_2S -gesättigten Lösung und daraus hergestelltem Derivat kalibriert. Die Verdünnungsreihen wurden mit Ellmans Reagens (DTNB, Ellman 1959) kalibriert. Dabei wurde davon ausgegangen, daß ein H_2S -Molekül mit zwei Reagensmolekülen vollständig reagiert (Weber et al. 1987). Auf diese Weise konnte freies Sulfid zweifelsfrei quantifiziert und neben anderen niedermolekularen Thiolen nachgewiesen werden.

Die Reaktion des Monobrombimans mit Polythiolen, wie zum Beispiel PC, ist nicht vollständig, so daß die eingesetzten PC-Komplexe über ihre Reaktion mit DTNB zusätzlich quantifiziert werden mußten. Zwei Beispiele für die HPLC-Elutionsprofile solcher Messungen sind in Abbildung 21 dargestellt. Mit diesem System wurde festgestellt, daß der aus C. fusca isolierte PC-Komplex 12 % des Schwefels als freies Sulfid enthielt. Auch PC-Präparationen aus Spermatophyten wurden mit diesem System analysiert, dabei wurde festgestellt, daß zum Beispiel hPC aus Glycine max 30 % des Schwefels als freies Sulfid enthielt, während Präparationen aus R. serpentina 1 % oder weniger freies Sulfid enthielten.

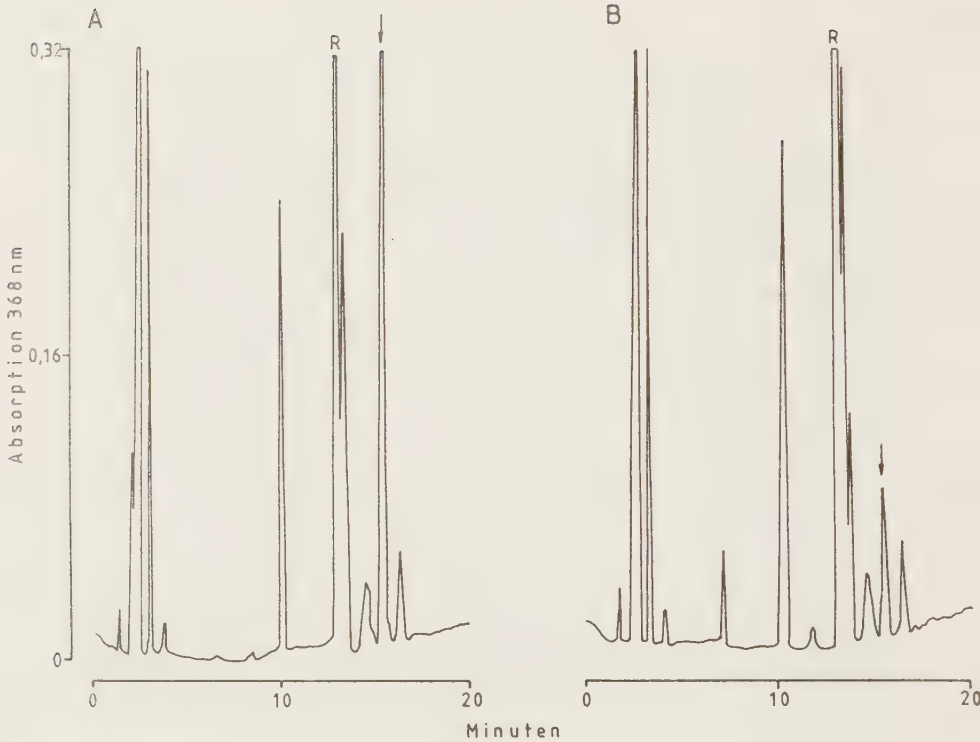


Abbildung 21

HPLC-Analysen nach Newton et al. (1981) von PC-Präparationen aus A: *Chlorella fusca* und B: *R. serpentina*, die mit Monobrombiman derivatisiert worden waren. Der Pfeil bezeichnet das Derivat des freien Sulfids, mit R ist das mit Mercaptoethanol umgesetzte überschüssige Reagens bezeichnet.

III.3.6 Induktion der Phytochelatin-Synthese in Algen durch verschiedene Schwermetalle

Die Identität des Schwermetall-Komplexierungsmechanismus der Algen mit dem von höheren Pflanzen impliziert, daß Algen ebenso wie die höheren Pflanzen durch einen weiten Bereich von Schwermetall-Ionen zu induzieren sind, der weit über die MT-induzierenden Schwermetalle hinausgeht (Grill, 1987). Das

gleiche Phänomen wurde ja auch in dieser Arbeit für die hPC-Synthese in *Fabales* nachgewiesen. Dem widersprachen die Berichte, daß Zn^{2+} nicht induzierend auf das Schwermetallbindende Material aus Arten von *Scenedesmus* (Stokes *et al.*, 1977), aus *Chlorella* (Hart und Bertram, 1980, Nagano *et al.*, 1982), und *Euglena* (Gingrich *et al.*, 1986) wirkt. Deshalb wurden an zwei einzelligen Grünalgen, *Scenedesmus acutiformis* und *Chlorella fusca*, verschiedene Schwermetalle und ihre Induktionswirkung auf die PC-Synthese getestet. Tabelle 11 faßt die an *C. fusca* erhaltenen Ergebnisse zusammen.

Metall (μM)	GSH	PC2	PC3 (nmol/mg Protein)	PC4	PC5	PC6	PC ind.
Ag (10)	108.2	10.5	1.0	0.0	0.0	0.0	23.9
Cd (20)	138.7	40.9	49.4	17.5	4.3	0.6	324.8
Cu (10)	72.6	52.2	0.1	0.1	0.0	0.0	105.0
Ga (20)	101.2	2.4	0.5	0.0	0.0	0.0	6.3
Hg (3)	305.8	15.4	2.6	0.0	0.0	0.0	38.8
Ni (20)	323.8	9.7	0.4	0.0	0.0	0.0	20.6
Pb (200)	72.3	14.4	11.4	4.4	1.8	0.4	91.9
Sn (20)	135.8	0.3	0.2	0.0	0.0	0.0	1.2
Zn (200)	112.8	0.3	0.1	0.1	0.0	0.0	1.1
Kontr.	121.1	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7

Tabelle 11

Induktion von PC in *Chlorella fusca* durch verschiedene Metalle. 1-Liter-Kulturen von *Chlorella fusca* in Fernbach-Kolben wurden unter den Bedingungen für die Anzucht von Suspensionskulturen höherer Pflanzen, ohne zusätzliche CO_2 -Begasung, 4 Tage angezogen und dann für weitere 6 Tage mit den angegebenen Konzentrationen von Schwermetallen in der in Abb. 12 angegebenen Ionenform belastet. Rohextrakte aus jeweils der Hälfte der Ernte wurden mit der Schnellmethode hergestellt und mit HPLC mit SH-Gruppen-spezifischer Detektion analysiert. Eine unbelastete Kultur diente als Kontrolle, diese enthielt keine PC-Peptide. Die Molmengen PC-Peptide und die in der letzten Spalte angegebene PC-Induktion (PC ind.; nmol Glu-Cys-Einheiten induziert) wurden aus den HPLC-Integrationsflächen berechnet. Protein wurde nach Bradford (1976) aus dem Rest der jeweiligen Kultur bestimmt. Zur Kontrolle dieser Bestimmung ist der Gehalt an GSH mit angegeben.

Verschiedene Schwermetalle, neben Cd^{2+} vor allem Pb^{2+} , Cu^{2+} ; deutlich auch Hg^{2+} , Ag^{2+} und Ni^{2+} , schwächer daneben Ga^{3+} , Sn^{2+} und auch Zn^{2+} induzieren eindeutig die Synthese der PC-Peptide. Die Reihenfolge der Induktionswirkungsstärke der verschiedenen Schwermetalle ist wieder eine andere als in R. serpentina und G. max. Die Induktion der PC-Synthese durch Zn^{2+} ist in Anbetracht der Kontroverse zu den Arbeiten anderer Autoren wichtig, Abbildung 22 zeigt die HPLC-Analyse dieser Induktion.

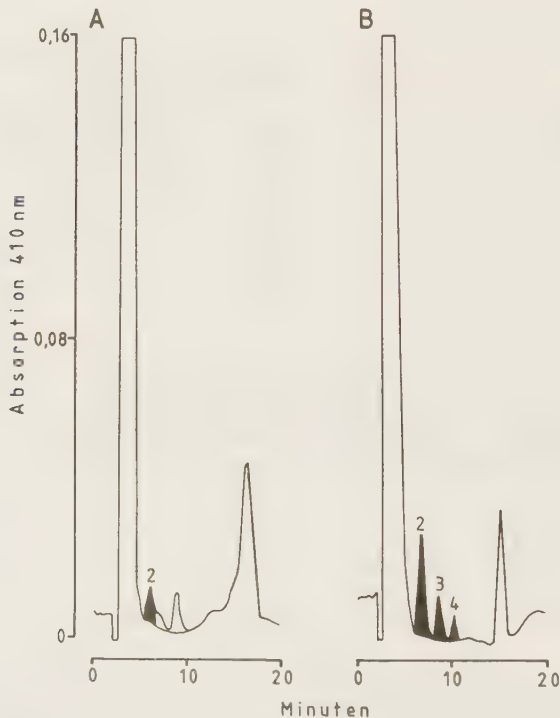


Abbildung 22

HPLC-Analysen mit SH-spezifischer Detektion von Schnellaufschlüssen aus 100mg (FG) Zellen von *Chlorella fusca*, die A: unbelastet (Kontrolle) und B: mit 200 µM Zn^{2+} belastet worden waren. Schwarz ausgefüllte Flächen repräsentieren PC-Peptide, die Indexzahlen n geben die Anzahl der darin enthaltenen Glu-Cys-Einheiten an.

Zn^{2+} zeigt eine verglichen mit den anderen Induktoren sehr schwache Wirkung, möglicherweise wurde die Induktion durch dieses Schwermetall deswegen von anderen Autoren (Stokes et al., 1977; Hart und Bertram, 1980; Nagano et al., 1982 und Gingrich et al., 1986) übersehen. Keine Induktion von PC wurde mit Mn^{2+} und Mg^{2+} erzielt. Dies spiegelt genau die von höheren Pflanzen bekannte Situation der Induktion der PC wieder.

III.3.7 Verbreitung der Phytochelatin-Synthesefähigkeit in den Phycophyta

Um die Ubiquität des PC-Systems auch in den Phycophyta nachzuweisen, wurden Angehörige von verschiedenen Klassen (aus 6 von 10 Klassen der Phycophyta) mit 20 - 50 μM Cd^{2+} für 2 - 10 Tage belastet. Unbelastete Zellen dienten wiederum als Kontrolle, mit Hilfe der Schnellaufschlußmethode und HPLC-Analyse wurde, wie für Spermatophyta beschrieben, die Induktion von PC-Peptiden analysiert. Tabelle 12 faßt die Ergebnisse zusammen: in allen untersuchten Algen wurde die induzierbare Synthese von SH-positiven Peptiden mit denselben Retentionszeiten wie PC aus R. serpentina festgestellt. Wiederum wurden verschieden starke SH-Induktionen festgestellt (Faktor 10 Unterschied zwischen Euglena und Monoraphidium), auch die relative Menge der einzelnen Peptide war unterschiedlich. Meistens dominierte PC 2, in Porphyridium, einer Rotalge, dominierte aber PC 4. Abbildung 23 zeigt 4 Beispiele von HPLC-Elutionsprofilen mit SH-spezifischer Detektion aus Cd^{2+} -belasteten Kulturen verschiedener Algen. In den Kontrollextrakten waren jeweils keine PC-Peptide festzustellen (unter der Nachweisgrenze von 0,02 nmol SH/mg Protein).

Art (Klasse)	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC ind. (nmol/mg Protein)
<i>Bumilleriopsis filiformis</i> (Xanthophyceae)	2.1	0.6	0.3	0.1	0.0	7.5
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Chlamydomonadales)	0.8	1.2	0.6	0.0	0.0	8.0
<i>Chlorella fusca</i> SAG 211-8b (Chlorophyceae)	1.7	2.0	0.6	0.2	0.1	13.5
<i>Euglena gracilis</i> Z-Stamm W.R. Evans (Euglenophyceae)	0.8	0.4	0.4	0.0	0.0	4.8
<i>Fragillaria crotonensis</i> (Chrysophyceae)	4.3	1.0	0.6	0.0	0.0	13.9
<i>Monoraphidium minutum</i> (Chlorophyceae)	5.6	5.9	2.9	0.5	0.1	43.9
<i>Navicula pelliculosa</i> (Bacillariophyceae)	7.7	4.0	2.9	1.2	0.0	44.8
<i>Porphyridium cruentum</i> SAG 1380-10 (Rhodophyceae)	1.9	1.1	1.9	0.2	0.0	15.6
<i>Sargassum muticum</i> (Phaeophyceae)	1.6	1.2	0.9	0.3	0.0	11.8
<i>Scenedesmus acutiformis</i> SAG 276-11 (Chlorophyceae)	3.1	1.8	0.7	0.2	0.0	15.4
<i>Stichococcus bacillaris</i> (Chlorophyceae)	0.9	1.5	1.9	0.4	0.1	16.3

Tabelle 12

Induktion von PC durch Cd^{2+} in verschiedenen Klassen der Phycophyta. Die Kulturen der Algen in den entsprechenden Medien waren für 2 - 10 Tage während der logarithmischen Wachstumsphase mit 20 - 50 μM Cd^{2+} belastet worden. Von den Schnellaufschlüssen aus 200 - 400 mg Zellen wurden 10 μl für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) abgenommen, der Rest wurde mit HPLC mit SH-Gruppen-spezifischer Detektion analysiert. Unbelastete Kulturen dienten als Kontrolle, diese enthielten jeweils kein PC. Aus den Integrationsflächen wurden die Molmengen PC-Peptide und die in der letzten Spalte angegebene PC-Induktion (PC ind.; nmol Glu-Cys-Einheiten induziert) errechnet. SAG: Stammnummern der Sammlung von Algenkulturen, Göttingen.

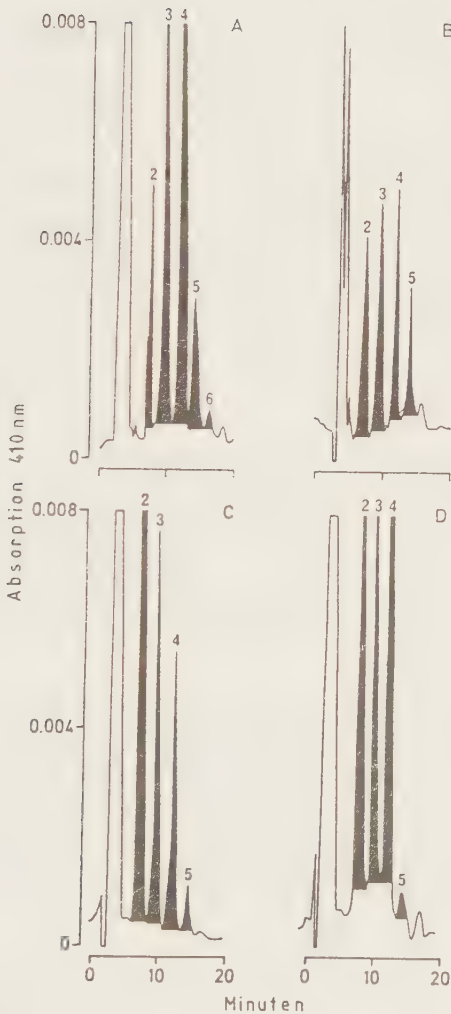


Abbildung 23

Elutionsprofile der HPLC-Analyse mit SH-spezifischer Detektion von Schnellaufschlüssen aus A: *Stichococcus bacillaris* (Chlorophyceae), B: *Navicula pelliculosa* (Bacillariophyceae), C: *Bumilleriopsis filiformis* (Xanthophyceae) und D: *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae). Schwarz ausgefüllte Flächen repräsentieren PC-Peptide, die Indexzahlen n geben die Anzahl der darin enthaltenen Glu-Cys-Einheiten an.

III.3.7 Phytochelatinsynthese in Pilzen

Bis jetzt war nicht ausgeschlossen worden, daß ein Organismus beide Systeme, PC-Synthese und MT-Synthese, zur Komplexierung von Schwermetall einsetzen könnte. Die Grenze der taxonomischen Verbreitung der Fähigkeit zur PC-Synthese ist noch nicht aufgezeigt. In diesem Zusammenhang sind die Berichte über Schwermetall-bindende Proteine bei den Pilzen interessant. Gene für MT-ähnliche Proteine aus Saccharomyces cerevisiae (Butt et al., 1984) und die Sequenz des MT aus Neurospora (Lerch, 1984) sowie Agaricus bisporus (Lerch und Beltramini, 1986) sind bekannt. Nach mehreren Revisionen (Murasugi et al., 1981, 1983; Kondo et al., 1983, 1984) veröffentlichten Kondo et al. (1985) die Struktur zweier Peptide (die sie Cadystin A und B nannten), die als "Metallothionein-ähnlich" bezeichnet wurden. Grill et al. (1986a) gelang es nachzuweisen, daß die Spaltheife Schizosaccharomyces pombe nicht nur die beiden Peptide Cadystin A (PC 3) und Cadystin B (PC 2), sondern den ganzen Satz homologer PC-Peptide mit $n = 2 - 7$, wie in der höheren Pflanze auch, synthetisiert. Zwischen den Gattungen Saccharomyces und Schizosaccharomyces könnte also die Grenze zwischen MT- und PC-Mechanismus verlaufen (Grill 1987).

Um nun herauszufinden, ob die Synthese von PC in Schizosaccharomyces pombe einen Einzelfall darstellt, oder eventuell eine Entsprechung in anderen Pilzarten findet, wurden insgesamt 117 verschiedene Arten von Ascomyceten und Basidiomyceten mit Cd^{2+} belastet und auf PC-Synthese analysiert. Die Pilze wurden dazu auf komplexen Medien auf Agarnährböden oder in Flüssigkultur kultiviert und für einen Tag mit $75 - 2000 \mu M$ Cd^{2+} belastet. In 13 dieser Pilze konnte PC-Induktion nachgewiesen werden. Tabelle 13 faßt die positiven Ergebnisse zusammen: alle untersuchten Schizosaccharomyceten zeigten tatsächlich PC-Synthese. Aber auch mehrere Heterobasidiomyceten (zum Beispiel Tilletiopsis und Platyglöea sowie Coleosporium und ein Homobasidiomycet, Amylostereum chailletii) zeigten PC-Synthese.

Art	PC2	PC3	PC4 (nmol/mg Protein)	PC5	PC6	PC ind.
<i>Amylostereum chailettii</i> FO 23466 ★	0.0	0.2	1.4	1.5	0.0	13.7
<i>Coleosporium tussilaginis</i> FO 28237 ●	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.7
<i>Platyglœa peniophorae</i> FO 22315 ●	2.8	2.2	0.7	0.1	0.0	15.6
<i>Rhodosporidium</i> sp. FO 25157-i ●	11.0	9.6	6.3	1.2	0.4	84.6
<i>Sarcoscypha austriaca</i> B 518	4.2	2.3	2.8	1.6	0.6	38.3
<i>Schizos. japonicus</i> DSM 70570	2.2	1.3	0.7	0.1	0.0	11.2
<i>Schizos. malidevorans</i> DSM 70572	2.5	0.5	0.1	0.0	0.0	6.8
<i>Schizos. octosporus</i> DSM 70573	0.6	0.7	0.2	0.0	0.0	3.8
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	7.4	8.4	1.1	0.4	0.0	46.7
<i>Schizosaccharomyces versatilis</i>	3.0	5.3	2.3	0.4	0.0	33.3
<i>Sporobolomyces holsaticus</i> DSM 70580 ●	10.0	7.5	4.1	0.0	0.0	59.2
<i>Sporobolomyces roseus</i> FO 29150-i ●	0.5	0.6	0.4	0.1	0.0	5.0
<i>Tilletiopsis</i> sp. FO 29220-i2	1.5	0.2	0.1	0.0	0.0	3.7

Tabelle 13

Induktion von PC in verschiedenen Arten der *Mycophyta*. Die Pilzkulturen waren für 1 - 3 Tage während der logarithmischen Wachstumsphase mit 500 μM Cd^{2+} belastet worden. Von den Schnellaufschlüssen aus 200-400 mg Zellen wurden 10 μl für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) abgenommen, der Rest wurde mit HPLC mit SH-Gruppen-spezifischer Detektion analysiert. Unbelastete Kulturen dienten als Kontrolle, diese enthielten jeweils kein PC. Die Molmengen PC-Peptide und die PC-Induktion (PC ind.; nmol Glu-Cys-Einheiten induziert) sind auf mg Protein bezogen. ●: Heterobasidomyceten ★: Homobasidomycet

In allen diesen Fällen handelt es sich um relativ einfach organisierte, einzellig wachsende Pilze. Als Beleg für die Identität des PC aus einem Heterobasidomyceten, einer nicht näher bestimmten Art von *Rhodosporidium*, mit PC aus grünen Pflanzen ist in Abbildung 24 die 2-dimensionale Dünnschichtchromatographie ("fingerprint"-Analyse) von PC3 und PC6 aus diesem Pilz wiedergegeben.

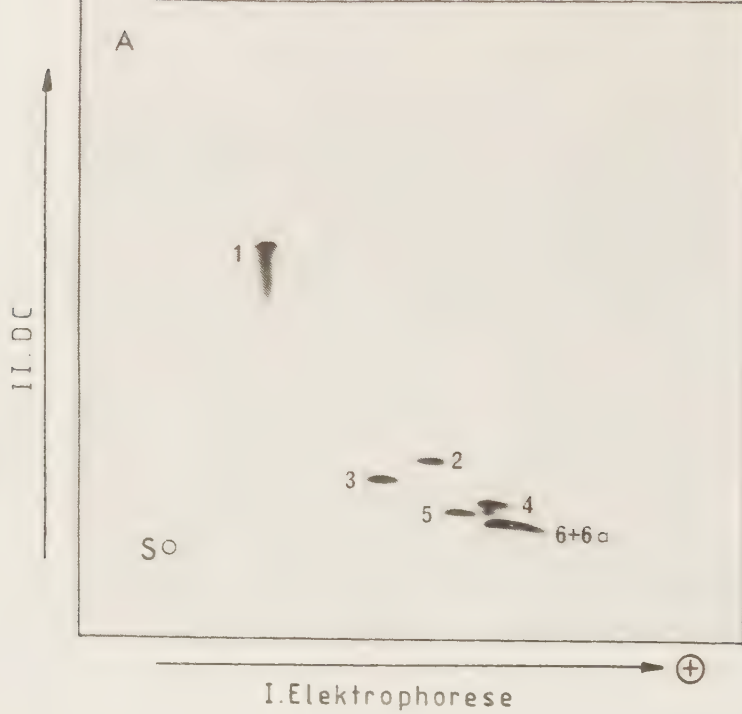


Abbildung 24

2-dimensionale Dünnschichtchromatographie von PC3 (A) und PC6 (B) aus Rhodospiridium sp.. Vorbereitung und Analyse der Proben erfolgte wie für Abb. 20 beschrieben. Die Aminosäureanalyse ergab folgende Sequenzen: 1: DNP-Glu, 2: DNP-Glu-Cys (DNP-GC), 3: DNP-GC-Glu, 4: DNP-(GC)₂, 5: DNP-(GC)₂-Glu, 6: DNP-(GC)₃, 7: DNP-(GC)₃-Glu, 8: DNP-(GC)₄, 9: DNP-(GC)₄-Glu, 10: DNP-(GC)₅, 11: DNP-(GC)₅-Glu, 12: DNP-(GC)₆, 6a: DNP-(GC)₃-Gly, 12a: DNP-(GC)₆-Gly.

Die Peptide wurden präpariert und analysiert wie für PC aus C. fusca beschrieben. Wenn auch PC3 in diesem Fall durch andere Peptide kontaminiert war, so belegen diese Bilder doch das Auftreten von PC in einem Heterobasidiomyceten. Saccharomyces cerevisiae, Neurospora crassa, Agaricus bisporus und Agaricus arvensis (bei diesen Organismen besteht kein Zweifel an der Synthese von MT-Proteinen) sowie Morchella esculenta und andere höher organisierte Pilze zeigten auch bei Variation aller maßgeblichen Versuchsparameter keine PC-Synthese.

Andere Mikroorganismen, wie zum Beispiel Bakterien (Bacillus subtilis, Staphylococcus carnosus, Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Alcaligenes eutrophus), sowie ein Archaeobakterium: Halobacterium halobium wurden ebenfalls untersucht und wiesen alle keine PC-Synthese auf. Letzterer Mikroorganismus ist durch das als lichtgetriebene Protonenpumpe wirksame Bacteriorhodopsin zu photosynthetischen Leistungen befähigt. Rhodospseudomonas viridis, ein photosynthetisierendes Eubakterium, wurde ebenfalls untersucht, ohne PC-Synthese zu zeigen. Die Fähigkeit zur PC-Synthese ist also weder an den Besitz von Chloroplasten oder auch nur Plastiden, noch an die Fähigkeit zur Photosynthese gekoppelt.

Sollte das PC-System vielleicht auf Eukaryonten beschränkt sein? Um diese provokant gestellte Frage zu untersuchen, wurde eine Kultur von Synechococcus (Synonym zu Anacystis nidulans) mit Cd²⁺ belastet und auf PC-Synthese hin analysiert. Durch HPLC-Analyse mit SH-spezifischer Detektion

konnte in diesem Bakterium ein induzierbarer Satz von Peptiden mit denselben Retentionszeiten wie PC aus R. serpentina belegt werden. Abbildung 25 A zeigt das HPLC-Elutionsprofil, die Identität der Retentionszeiten mit PC aus R. serpentina wurde durch Cochromatographie nachgewiesen. Aus den belasteten Zellen konnte der Schwermetall-bindende Komplex aber nicht mit den beschriebenen Methoden isoliert werden. Der Nachweis der PC-Monomeren wurde deshalb nicht geführt. Mit Rücksicht auf die Arbeiten von Olafson et al. (1979, 1980) und Olafson (1984, 1986), die ein "Cyanobakterielles Metallothionein" (expressis verbis) in diesem Mikroorganismus nachwiesen, wird hier nicht behauptet, Cyanobakterien synthetisierten PC. Die aus Synechococcus erhaltenen Chromatogramme rechtfertigen jedoch weitere Untersuchungen in dieser Richtung.

Zusätzlich zu den Untersuchungen an Pilzen, die ein zweifelsfrei nachgewiesenes MT-Protein synthetisieren, wurden auch in Kontroll- und Cd^{2+} -belastetem Medium angezogene Salinekrebs, sowie die Nieren und Lebern von Cd^{2+} intoxizierten Ratten (siehe Kap. III.5) analysiert, es wurden in diesen Organismen keine PC-Peptide festgestellt (siehe Abbildung 25 B). Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß entweder der eine (MT) oder andere (PC) Mechanismus verwirklicht ist, um Schwermetalle zu komplexieren.

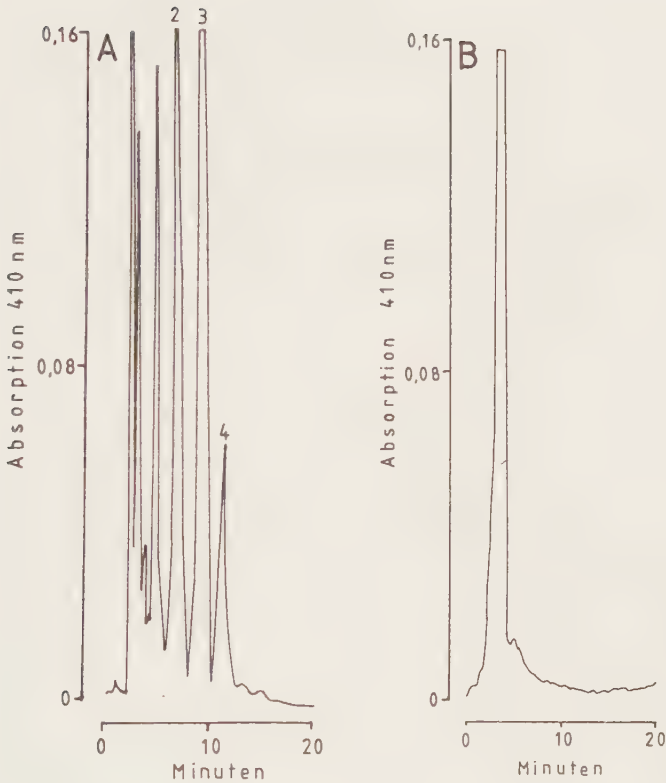


Abbildung 25

HPLC-Analyse mit SH-spezifischer Detektion von Schnellaufschlüssen aus A: *Synechococcus* IP 6437 und B: *Anthemia salina*. A: Die Kultur war für 2 Tage während der logarithmischen Wachstumsphase mit $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$ belastet worden. Die Injektion entsprach $0,3 \text{ mg Protein}$; gegenüber der Kontrolle, die kein PC enthielt, wurden $47 \text{ nmol SH/mg Protein}$ induziert. Die Indexzahlen bezeichnen die Anzahl von Glu-Cys-Einheiten in PC-Peptiden aus *R. serpentina*, die zu entsprechenden Zeiten eluierten. B: Die Injektion entsprach 400 mg (FG) von Tieren, die für 2 Tage mit $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$ belastet worden waren.

III.4 Intrazelluläre Lokalisation des PC-Systems

III.4.1: Aufnahme von Schwermetallen in Pflanzenzellen

Nach den Experimenten, die in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt wurden, stellten sich neue Aufgaben im Verlauf der vorliegenden Arbeit. Mit welchem Mechanismus nehmen die Pflanzen Schwermetalle aus dem umgebenden Medium auf, und ist an dieser Aufnahme auch PC beteiligt? Welchen Weg nehmen die Schwermetalle in der Pflanzenzelle, und wo werden sie deponiert? Diese Fragen sollen im Folgenden untersucht werden.

Nach den in der Einleitung dargelegten Gesichtspunkten ist für die Aufnahme von Schwermetallen in Pflanzen die Synthese spezifischer Liganden, wie wir jetzt wissen: der Phytochelatine wichtig. Deren Beteiligung am eigentlichen Aufnahmevergange durch die Zellmembran ist nun zu untersuchen. Der Vorgang der Endocytose, der in tierischen Zellen wohluntersucht ist und die Aufnahme von Partikeln und gelösten Stoffen vermittelt (Steinman et al. 1983), wurde für Pflanzenzellen erst vermutet, nachdem über "coated pits" (Franke und Herth 1974) und in neuerer Zeit ein "partially coated reticulum" (Pesacreta und Lucas 1984) in Pflanzenzellen berichtet worden war. Neuere Arbeiten über Aufnahme kationischen Ferritins durch "coated vesicles" (wegen des Clathrin-Mantels im Folgenden als "Clathrinvesikel" übersetzt) in Protoplasten von Bohnen (Joachim und Robinson, 1984) und Sojabohnen (Tanchak et al., 1984) wiesen erstmals Endocytose in pflanzlichen Systemen nach. Während kationisches Ferritin, ein polyvalenter Modell-Ligand von 13 nm Ø nicht durch die Zellwandporen mit 4 nm Ø dringen kann, gelangen Hübner et al. (1985) der Nachweis von Endocytose an Maiswurzelspitzenzellen - mit Zellwand, das bedeutet Einstülpung der Membran gegen den Zellturgor! - nach Belastung mit $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ und $\text{La}(\text{NO}_3)_3$. Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, daß elektronendichte Präzipitate in Membranausstülpungen der Plasmamembran ("coated pits") und in Vesikeln (mit und ohne

Clathrin-Mantel) internalisiert, transportiert und schließlich auch in der Vakuole gefunden wurden. Außerdem wurde ein erheblicher Anteil des elektronendichten Materials an der Außenseite des Plasmalemmas festgelegt (Hübner et al. 1985). Auch der Zellwand selbst wurde eine Funktion in Akkumulation von Blei und Toleranz gegen Zink und Blei zugeschrieben. Poulter et al. (1985) untersuchten Zellkulturen eines gegen Zink und Blei toleranten und eines gegen diese Schwermetalle sensitiven Stammes von Anthoxanthum odoratum (Ruchgras) und fanden, daß im Gegensatz zu den intakten Zellen die Protoplasten beider Stämme gleich sensitiv gegen Blei und Zink waren. An Wurzelspitzen des toleranten und des sensitiven Stammes von Anthoxanthum odoratum bestätigten Qureshi et al. (1986) dieses Ergebnis. Nach Belastung mit $30 \mu\text{M Pb}^{2+}$ ließ sich das Blei in den Zellwänden und im Cytosol der sensitiven Zellen durch Röntgenemissionsanalyse nachweisen, während die Zellwände der toleranten Zellen Blei akkumulierten und vom Cytosol zurückhielten. Der Toleranzmechanismus wurde deshalb als Eigenschaft der Zellwand angesehen. Dieser Mechanismus ist kein Einzelfall: Auch in der Alge Stigeoclonium tenue, dem Moos Rhytidiadelphus squarrosus, Zellkulturen von Populus maximowiczii sowie in Zea mays und Potamogeton pectinatus wurde dieses Phänomen beobachtet (Qureshi et al., 1986).

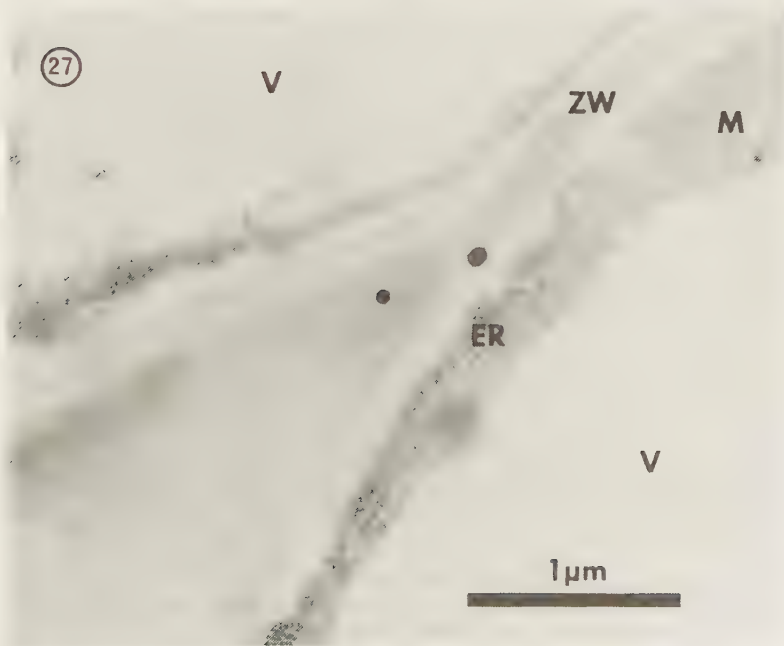
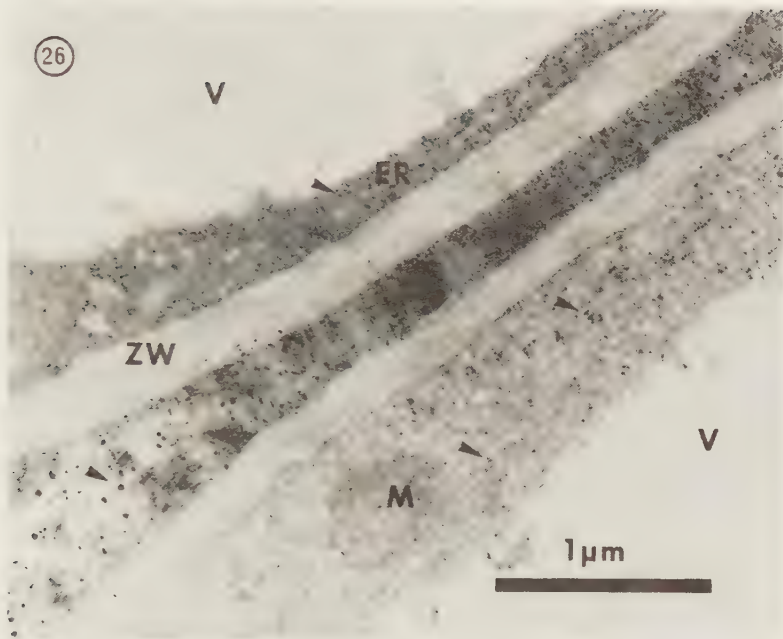
Dem gegenüber stehen die Beobachtungen, daß Pb^{2+} in Suspensionskulturen von R. serpentina (Grill et al. 1985 b) und Glycine max (diese Arbeit) PC bzw. hPC induziert und von diesem komplexiert wird. Drei für pflanzliche Systeme noch offene Fragen stellten sich zunächst: a) werden in Suspensionskulturen Clathrinvesikel durch Pb^{2+} induziert; b) ist PC eventuell mit diesen Vesikeln assoziiert; und c) wo sind Pb und PC kompartimentiert?

Als Versuchsobjekt zur Beantwortung dieser Fragen wurde die hinsichtlich der SM -Komplexierung bereits gut untersuchte Suspensionskultur von R. serpentina ausgewählt. Die Suspen-

sionskulturen wurden für diese Versuche mit 1 mM Pb^{2+} belastet (Toleranzkurve siehe Abbildung 11), da Blei mit seiner hohen Ordnungs- und Massenzahl sehr elektronendicht ist. Dieses Element kann deshalb elektronenmikroskopisch lokalisiert werden.

Um zunächst die Verteilung von Blei in intakten Zellen zu untersuchen, wurde eine Suspensionskultur von R. serpentina für 2 Tage mit 1 mM Pb^{2+} belastet. Die geernteten und gründlich gewaschenen Zellen wurden für elektronenmikroskopische Untersuchungen nach Standardmethoden fixiert und eingebettet. Die Bilder von Ultradünnschnitten aus Präparaten belasteter und unbelasteter (Kontroll-) Zellen zeigen die Abbildungen 26, 27 und 28. Diese Ultradünnschnitte wurden ohne Nachkontrastierung mikroskopiert, um das Blei lokalisieren zu können. Der Bildkontrast ist daher gering, aber alle wesentlichen Zellkompartimente sind gut erkennbar. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen (Abbildung 27) sind in den belasteten Zellen deutlich elektronendichte Präzipitate zu erkennen, die dem Plasmalemma außen aufliegen (Abbildungen 26 und 28). Dies stimmt mit den Beobachtungen von Hübner et al. (1985) überein. Präzipitate geringerer Größe finden sich aber auch verteilt im cytoplasmatischen Bereich. Die Zellwand selbst enthält kaum Präzipitate, das im Interzellularbereich erkennbare Material (Abb. 26) ist demgegenüber mit dem Hauptteil der Präzipitate durchsetzt. Zur Darstellung vesikulärer Strukturen wurden die Ultradünnschnitte mit Nachkontrastierung mikroskopiert (Bilder nicht gezeigt), Clathrinvesikel wurden aber nicht beobachtet. Diese wurden also, wenn überhaupt, nur in sehr geringer Zahl induziert.

Um zu untersuchen, ob Clathrinvesikel vorhanden oder andere vesikuläre Strukturen und damit parallel PC an der Aufnahme von Pb^{2+} in Suspensionskulturzellen von R. serpentina beteiligt sind, mußten Vesikel aus großen Mengen Gewebekultur isoliert werden. Depta und Robinson (1986) beschrieben eine Methode zur Präparation von Clathrinvesikeln aus Suspensionskulturen von Daucus carota. Aus den Zellen wurde durch



Abbildungen 26 und 27

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten durch belastete (26) und unbelastete (27) Zellen von R. serpentina. Die Schnitte wurden nicht nachkontrastiert. Bei den zwei aneinandergrenzenden Zellen erkennt man: Zw = Zellwand, V = Vakuole, M = Mitochondrium, ER = rauhes endoplasmatisches Retikulum. In den belasteten Zellen sind sehr elektronendichte Partikel zu erkennen (Pfeile; größere im der Interzellularbereich, kleinere verteilt im Cytoplasma), die in den unbelasteten Zellen nicht zu sehen sind.



Abbildung 28

Ultradünnschnitt durch zwei aneinandergrenzende Zellen von R. serpentina, (mit Pb^{2+} belastet; Ultradünnschnitt ohne Nachkontrastierung). Zw = Zellwand, Pl = Plasmalemma, V = Vakuole, P = Plastid, M = Mitochondrium, * = Vesikel. Bleipräzipitate treten bevorzugt an der Zellwandseite des Plasmalemmas und verteilt im Cytosol auf.

Mörserhomogenisation ein Rohextrakt hergestellt, daraus durch differentielle Zentrifugation (20/100 x 1000 x g) eine Roh-Vesikelpräparation hergestellt und diese über einen RNase-Verdau, Saccharosedichtegradienten und schließlich D₂O-Ficoll-Dichtegradienten endgereinigt. Im Ficoll-Dichtegradienten werden 2 nahe benachbarte Banden gefunden, von denen die mit höherer Dichte Clathrinvesikel enthält (Depta und Robinson 1986). Nach dieser Vorschrift wurden aus Kulturen von R. serpentina (ca. 400 g Frischgewicht), die 0,5 - 3 Tage mit 1 mM Pb²⁺ belastet worden waren, Vesikel isoliert. Dabei wurde im D₂O/Ficoll-Gradienten (Abbildung 29) ausschließlich die Bande mit geringerer Dichte (A) gefunden. In unbelasteten Kontrollen war immer die Bande bei höherer Dichte (B) vorhanden, daneben fand sich sehr schwach (Pfeil in Abb. 29) bis höchstens gleich stark ausgeprägt auch die Bande bei geringerer Dichte.

In den Fraktionen der Aufarbeitung wurden die Gehalte an Protein, PC und Blei gemessen. Tabelle 14 stellt die Daten zusammen.

Fraktion	Protein (mg)	Blei (nmol)	Blei (%Ausb.)	PC * (nmol)	PC * (%Ausb.)	Blei (nmol/mg Protein)	PC * (nmol/mg Protein)
Überstand	540.5	98230	100.0	276783	100.0	181.7	512.1
Vesikel, Roh	11.0	1815	1.8	1890	0.7	165.0	171.8
RNase-Verdau	6.0	1353	1.4	445	0.2	225.4	74.2
Saccharosegrad.	1.6	28	0.0	0.0	0.0	17.5	0.0
D2O/Ficoll-Grad.	0.2	3	0.0	0.0	0.0	13.5	0.0

Tabelle 14

Biochemische Daten einer Vesikelaufarbeitung aus 420 g (FG) Suspensionskulturzellen von R. serpentina, die mit 1 mM Pb²⁺ für 2 Tage während der logarithmischen Wachstumsphase belastet worden waren. *: PC ist als die Summe der in den einzelnen Monomeren enthaltenen Molmengen Glu-Cys-Einheiten angegeben.

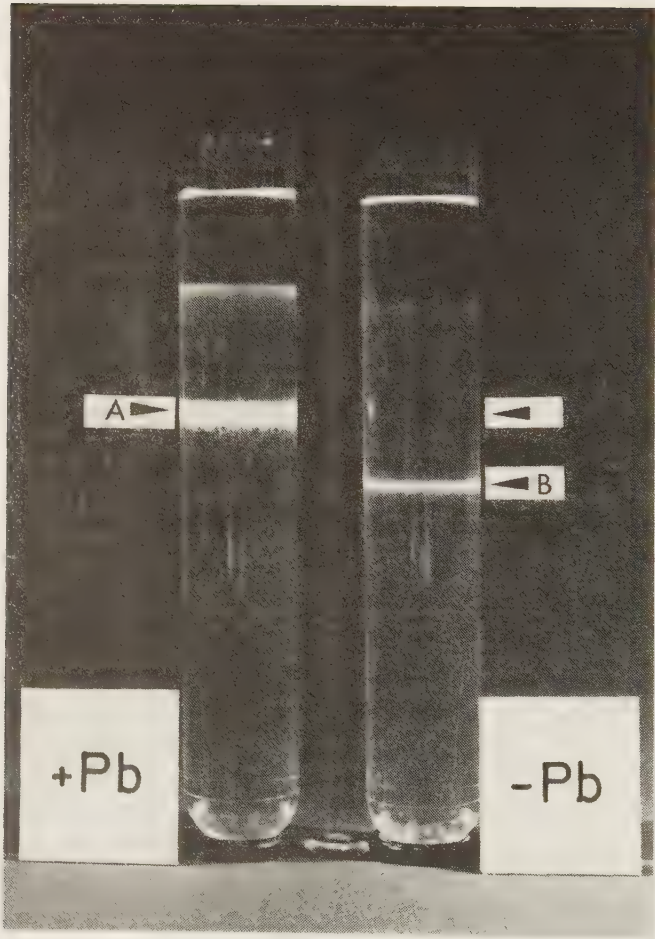


Abbildung 29

D₂O/Ficoll-Dichtegradienten nach Zentrifugation mit Vesikelpräparationen aus belasteter (+Pb) und unbelasteter (-Pb) *R. serpentina*. Die mit A und B bezeichneten Banden wurden entnommen und analysiert (Daten siehe Tabelle 14). Bei der Dichte der Bande A aus belasteter Probe (+Pb) wurde auch in der unbelasteten Probe in einzelnen Präparationen eine schwache Bande gefunden (Pfeil). Alle drei Banden enthielten Vesikel, die sich im elektronenmikroskopischen Bild nicht unterschieden.

In den durch differentielle Zentrifugation erhaltenen Vesikeln (Roh) ist zunächst PC und Pb^{2+} vorhanden. Mit fortschreitender Reinigung nahm der Gehalt der Vesikel an PC von unter 1% des PC im Überstand weiter ab, bis schließlich in der reinen Vesikelfraktion kein PC und nur Spuren von Blei übrig waren. Das Molverhältnis von Sulfhydrylgruppen zu Schwermetall – ein Maß für die Reinheit von PC-Komplexen, für Pb^{2+} werden Werte um 2 gefunden – nahm von 2,8 im Überstand über 1,0 in den Vesikeln bis auf 0,3 nach dem RNase-Verdau ab. Auch auf Protein bezogen wurde eine Verminderung an Blei und PC gegenüber dem Überstand festgestellt. Es wurde ein gleiches oder ähnliches Gemisch von PC-Monomeren in den Vesikeln wie im Überstand festgestellt.

Ein elektronenmikroskopisches Bild, negativkontrastiert mit Phosphorwolframsäure, der Vesikelpräparation nach dem Saccharosedichtegradienten zeigt Abbildung 30: die Präparation enthält Vesikel mit 100 – 300 nm $\varnothing$, Clathrinvesikel sind nicht vorhanden. Die Vesikel sind alle "glatt", d. h. frei von Ribosomen. "Knospende" Vesikel sind typisch, diese sind vermutlich diktyosomalen Ursprungs. Alle aus dem in Abbildung 29 dargestellten Gradienten erhaltenen Vesikelpräparationen hatten diese Zusammensetzung. Solchen Vesikeln werden intrazelluläre Transportfunktionen zugeschrieben (Steinman et al. 1983). Nun mußte untersucht werden, ob Blei in den aus R. serpentina präparierten Vesikeln lokalisiert ist oder als Kontamination in die Präparation verschleppt wurde.

Die Methode der Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure ist gut geeignet, Membranen darzustellen. Das verwendete Wolfram ist aber wie Blei sehr elektronendicht und maskiert eventuell in der Probe vorhandene Blei-Präzipitate, PC-Komplexe wären nicht zu erkennen. Um PC im Elektronenmikroskop theoretisch sichtbar zu machen, werden besonders hohe Anforderungen an das praktische Auflösungsvermögen gestellt, das außer von den Apparatekonstanten auch von der Geometrie der Probe bestimmt wird.

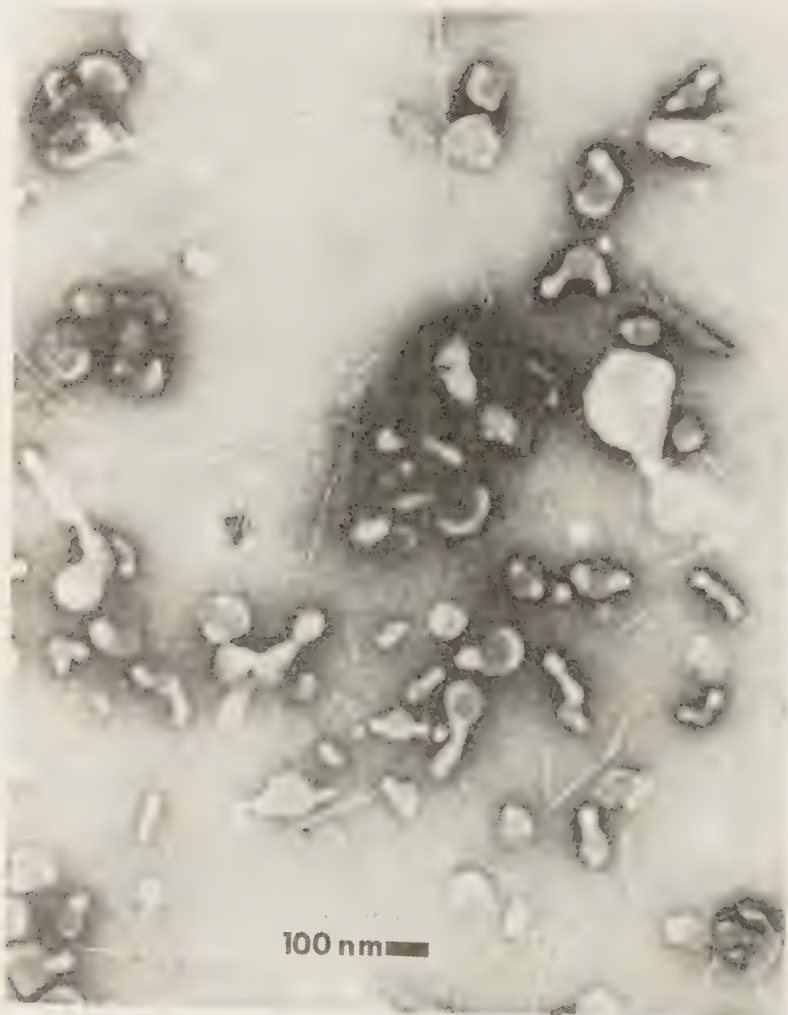


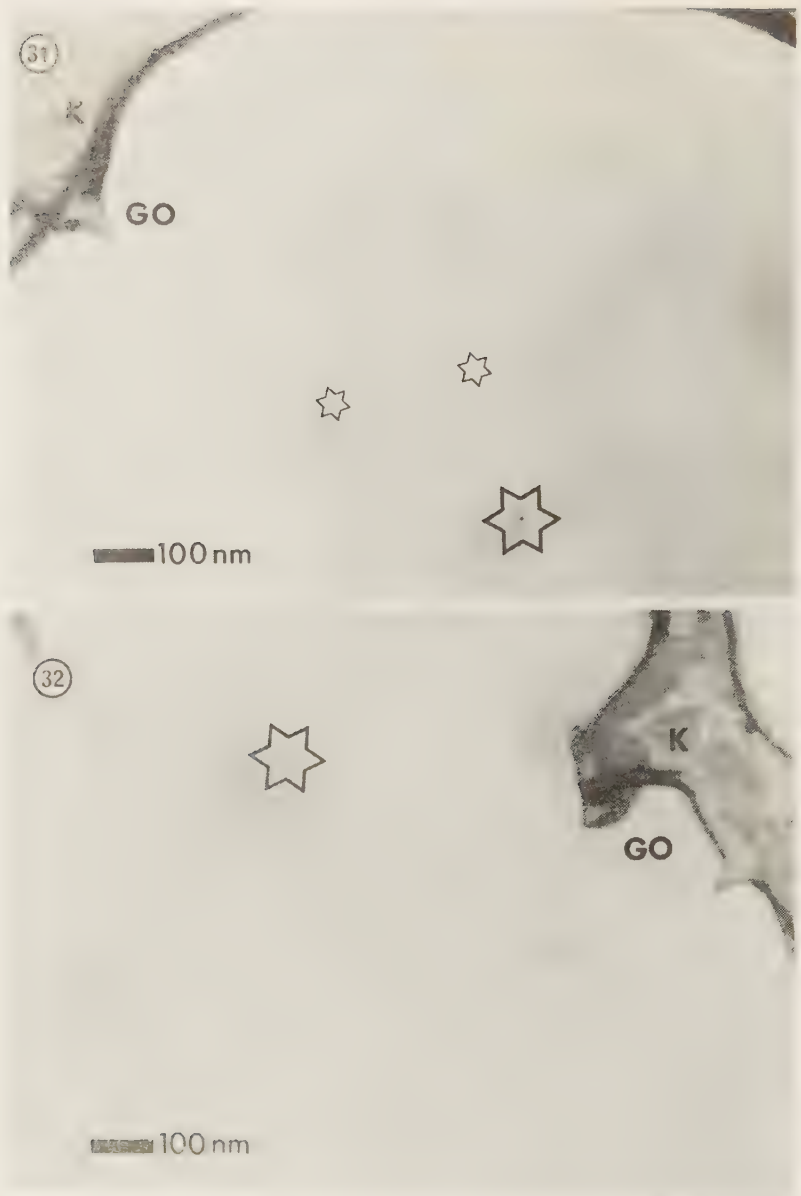
Abbildung 30

Vesikelpräparation aus *R. serpentina* nach der Reinigung durch Saccharosedichtegradienten (Präparation auf Kohlefolie, Negativkontrastierung mit 1% Phosphorwolframsäure). Die Fraktion besteht überwiegend aus Vesikeln von 100 - 300 nm Ø. "Knospungen" deuten auf einen dictyosomalen Ursprung hin. Bei den stäbchenförmigen Strukturen handelt es sich vermutlich um Zellulosefibrillen.

Um eine besonders hohe Auflösung erzielen zu können, wurden die Proben ohne Nachkontrastierung direkt auf Kupfernetze mit Kohle-Lochfolien, überbrückt mit monomolekularen Schichten von monokristallinem Graphitoxid aufgebracht (Formanek 1979). Diese Methodik gewährleistet ein praktisches Auflösungsvermögen von 0,225 nm (H. Formanek, pers. Mitteilung), das für das Sichtbarmachen von PC-Komplexen ausreicht.

Durch differentielle Zentrifugation und RNase-Verdau gereinigte Vesikelpräparationen aus belasteten Kulturen (die PC und Blei enthielten) und unbelasteten Kontrollen wurden auf diese Weise untersucht. Das Ergebnis zeigen die Abbildungen 31 und 32: in dem Bild der Vesikel aus unbelasteter Kultur (Abb. 32) sind keine Präzipitate zu erkennen, in den Vesikeln aus der belasteten Kultur sind einzelne elektronendichte, punktförmige Aggregate zu erkennen (Abb. 31). Der Durchmesser dieser Partikel von ca. 8 nm könnte durchaus den in einem Komplex aus z.B. je einem PC2, PC3 und PC4 komplexierten 5 Pb^{2+} -Ionen (Durchmesser: je 2,6 nm) entsprechen. Die Vesikel selbst können, wie ausgeführt, in dieser Technik nicht gut dargestellt werden. Die Vesikelmembranen sind mit 2 x 50 nm mehrfach dicker als die Trägerschicht mit 20 nm, deshalb sind sie als graue "Schatten" zu sehen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß in R. serpentina die erhaltenen einheitlichen Präparationen glatter Vesikel zu Anfang der Reinigung PC und Blei, mit zunehmendem Fortschritt der Reinigung aber kein PC mehr und nur sehr wenig Blei enthielten. Dies kann durch Ausschleusung des Pb^{2+} und des PC aus den Vesikeln während der Dauer der Reinigungsprozedur (2 Tage) verursacht sein. Clathrinvesikel wurden nicht gefunden, die Suspensionskultur von R. serpentina unterscheidet sich in dieser Hinsicht signifikant von der von Depta und Robinson (1986) verwendeten Kultur von Daucus carota.



Abbildungen 31 und 32

Vesikelpräparationen nach RNase-Verdau aus mit Pb belasteten (31) und unbelasteten (32) Suspensionskulturen von *R. serpentina*. Die Vesikel wurden auf monokristallinen, monomolekularen Graphitoxidschichten (GO), die auf Kohle-Lochfolien (K) gelegt wurden (Formanek 1979) ohne Kontrastierung aufgenommen. In der Probe aus belasteten Zellen waren deutlich elektrondichte Partikel (innerhalb der Sterne) zu sehen. Die Präparationen wurden nicht kontrastiert, die Vesikel erscheinen deshalb nur als graue "Schatten".

III.6.2: Intrazelluläre Verteilung von PC

Nachdem Blei und PC nur in geringen Mengen in Vesikeln lokalisiert werden konnten, während die Hauptmenge im Überstand der Vesikelzentrifugation gefunden worden war, mußte untersucht werden, ob das PC im freien cytoplasmatischen Raum oder in Zellorganellen lokalisiert ist. Nach den Berichten über Anhäufung von Zink in Vakuolen von Silene cucubalus (Mathys, 1977) und von Nickel in Vakuolen von Arten von Alyssum und Hybanthus (Kelly et al., 1975) hatte Grill (1987) untersucht, ob PC in Vakuolen von R. serpentina lokalisiert ist. Die aus Cd^{2+} -belasteten Suspensionskulturen isolierten Protoplasten enthielten fast die gesamte in intakten Zellen gefundene Menge Cd^{2+} und PC, in den daraus präparierten Vakuolen wurde weder PC noch Cadmium gefunden. Das PC-System mußte deshalb in der Cytoplasmafraktion einschließlich Organellen lokalisiert sein. Zellorganellen wie Mitochondrien und Plastiden wären bei der beschriebenen Reinigungsprozedur für Vesikel nicht intakt geblieben und hätten ihren Inhalt in den Überstand abgegeben. Um die Verteilung von Blei und PC in Suspensionskulturzellen genauer zu untersuchen, mußten daraus reine Präparationen von Plastiden und Mitochondrien sowie Peroxisomen isoliert werden.

Während die Isolierung von Chloroplasten aus besonders geeigneten differenzierten Pflanzen, z. B. Spinat und Erbsen eine seit mehreren Jahren etablierte Methode ist (Walker 1964), wurden erst in neuerer Zeit Präparationen intakter, chlorophyllfreier Mitochondrien und Peroxisomen aus differenzierten Pflanzen erhalten (Schwitzguebel und Siegenthaler, 1984). Eine erste Mengenisolierung von Etioplasten aus Roggen und anderen Gramineen (Monocotyledonae) gelang Kannangara et al. (1977). Erst in jüngster Zeit wurden aus besonders geeignetem Gewebe einer dicotyledonen Pflanze (Pisum sativum) Etioplasten gereinigt (Soll et al., 1986, Schindler und Soll, 1986). Für die Isolierung von Etioplasten waren wegen deren verglichen mit Chloroplasten ge-

ringerer Größe und veränderter Schwimmdichte verfeinerte Methoden notwendig (Soll et al., 1986). Über die Isolation größerer Mengen von Zellorganellen aus Suspensionskulturen lagen nur eigene Ergebnisse über die Isolation von Mitochondrien aus Suspensionskulturen von Solanum tuberosum vor (Gekeler 1984). Die Isolierung intakter Zellorganellen aus Suspensionskulturzellen ist aus mehreren Gründen sehr schwierig: Plastiden und Mitochondrien sind in Zellsuspensionskulturen von geringer Größe (2 - 3 μm) und wenig differenziert, wie zum Beispiel im elektronenmikroskopischen Bild (Abbildung 28) zu sehen ist. Vom ohnehin geringen Teil des Cytoplasmas am gesamten Volumen der Zelle stellen die Plastiden in Suspensionskulturen immerhin noch einen erheblichen Anteil (5-10%), während die Mitochondrien nur ca. 1% Volumenanteil stellen und deshalb eine geringe Ausbeute zu erwarten ist. Ferner sind Suspensionskulturzellen besonders schwierig schonend aufzuschließen: die Aggregate intakter Zellen sind bereits kleiner als die optimalen Bruchstücke in Aufschlüssen differenzierter Gewebe! Zum Zerschlagen solcher kleiner Aggregate sind besonders hohe Scherkräfte notwendig, schon freigesetzte Organellen werden dabei zerstört. Die geringe zu erwartende Ausbeute macht das Aufarbeiten ca. 20fach größerer Gewebemengen notwendig.

Weil Etioplasten bisher erfolgreich sowohl aus monocotyledonen Pflanzen als auch aus Spinat und Erbse (dicotyledonen Pflanzen) isoliert worden waren, wurde entschieden, diese schwierige Isolation mit Zellkulturen sowohl einer dikotyledonen Pflanze (R. serpentina) als auch einer monocotyledonen Pflanze (Dioscorea composita) zu versuchen. Dazu wurde ein Nachbau des von Kannangara et al. (1977) entwickelten, mit Rasiermesserklängen versehene Messerhomogenisators verwendet. Die Isolationsprozeduren für Etioplasten von Soll et al. (1986) und Schindler und Soll (1986) und die Prozedur von Schwitzguebel und Siegenthaler (1984) für die Isolierung von Mitochondrien und Peroxisomen sind einander in den ersten Schritten so ähnlich, daß die Aufarbeitung und differen-

tielle Zentrifugation für beide Methoden einander angeglichen wurde und die erhaltenen rohgereinigten Organellenpräparationen mit 2 verschiedenen Dichtegradienten-Zentrifugationsmethoden weiter gereinigt wurden. Dabei befanden sich die Organellen durch die ganze Reinigungsprozedur im selben Puffer. Abbildung 33 zeigt Dichtegradienten mit Präparationen von Mitochondrien und Peroxisomen sowie mit Plastiden aus Dioscorea composita. Die Organelloruchstücke und kontaminierenden Zellbestandteile stellten den Hauptteil des aus der differentiellen Zentrifugation erhaltenen, auf die Dichtegradienten aufgetragenen Materials. Die intakten Organellen konnten in diskreten Banden abgetrennt werden.

Die Organellpräparationen wurden mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen auf ihre Reinheit überprüft. Dies ist zwar eine sehr aufwendige Methode, aber das elektronenmikroskopische Bild kann deutlicher als enzymatische Tests das Vorhandensein der erwünschten Strukturen und die Abwesenheit kontaminierender Strukturen nachweisen und gleichzeitig den Intaktheitsgrad der interessierenden Organellen belegen, der für die vorliegende Fragestellung besonders wichtig war: der Organelleninhalt durfte während der Präparation ja nicht ausfließen. Die Abbildungen 34 - 37 zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen, wie sie aus jeweils 4 Präparationen aus R. serpentina und Dioscorea composita erhalten wurden. Während aus der monokotyledonen Dioscorea composita eine homogene Plastidenpräparation erhalten wurde (Abbildung 35), war es nicht möglich, aus R. serpentina intakte Plastiden zu isolieren (Abbildung 34). Über die in den Präparationen aus R. serpentina vorhandenen Strukturen lassen sich nur spekulative Äußerungen machen, für eine Interpretation im Hinblick auf die anstehende Fragestellung boten die Präparationen trotz Variation aller maßgeblichen Parameter keinen Anhaltspunkt.

Sowohl aus Dioscorea composita als auch aus R. serpentina konnten Präparationen intakter Mitochondrien erhalten werden. Die Präparation aus R. serpentina (Abb. 36) war aber

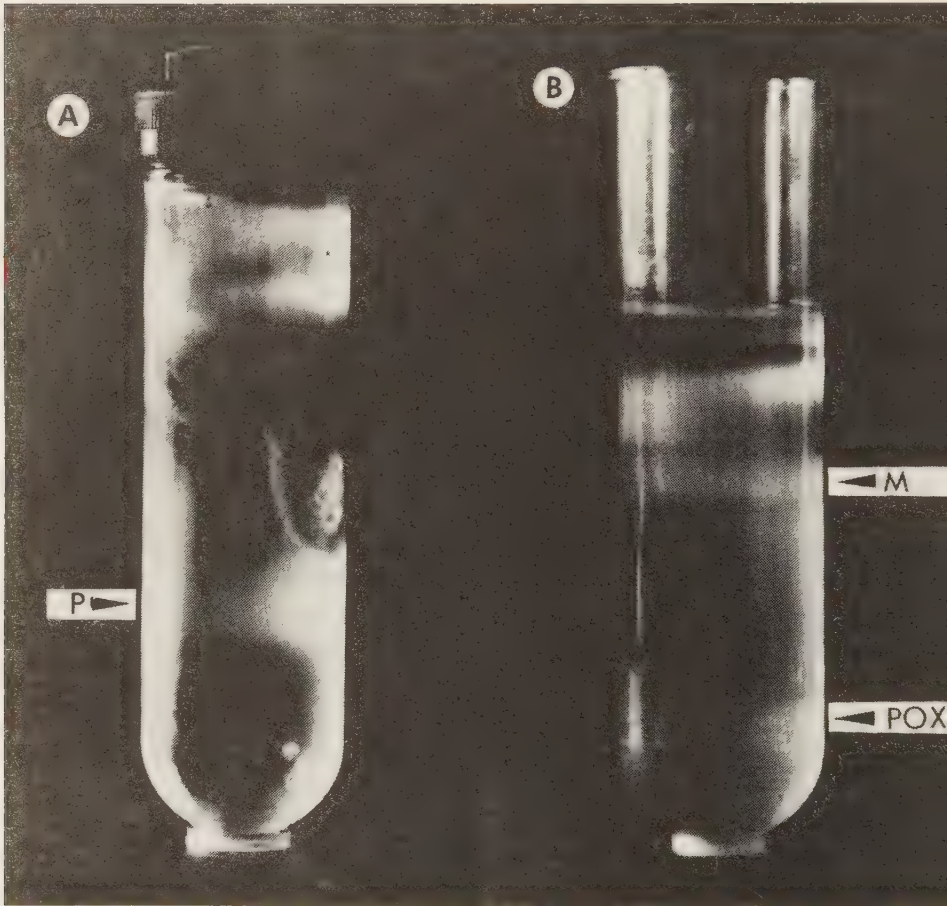
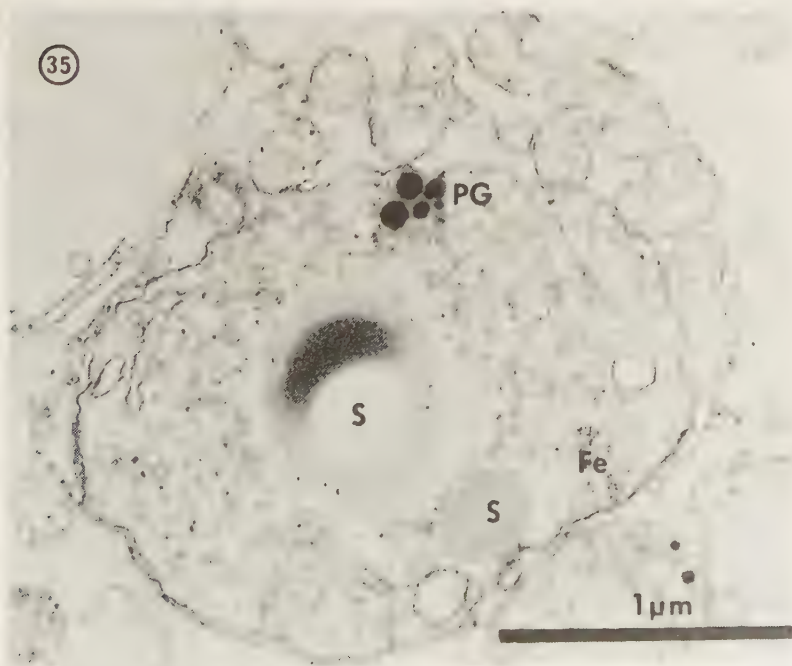
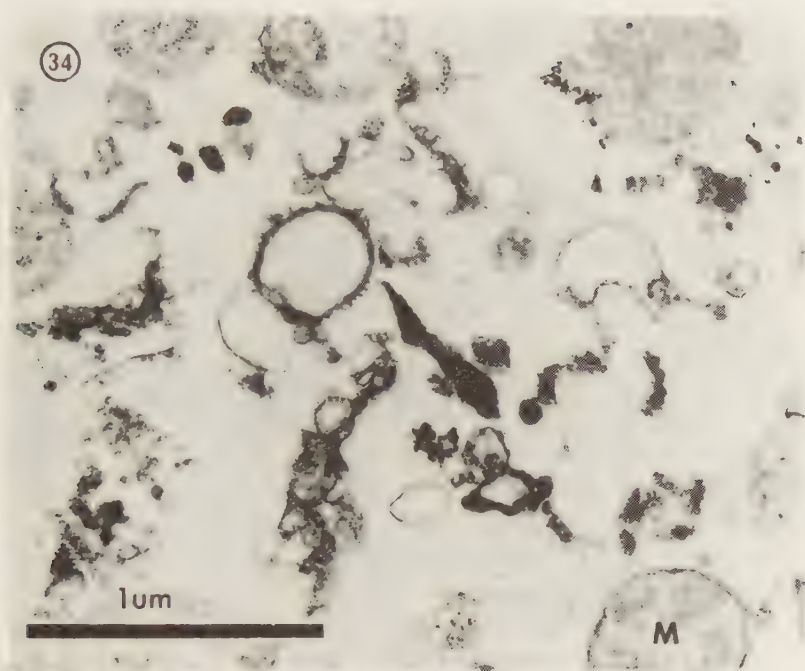
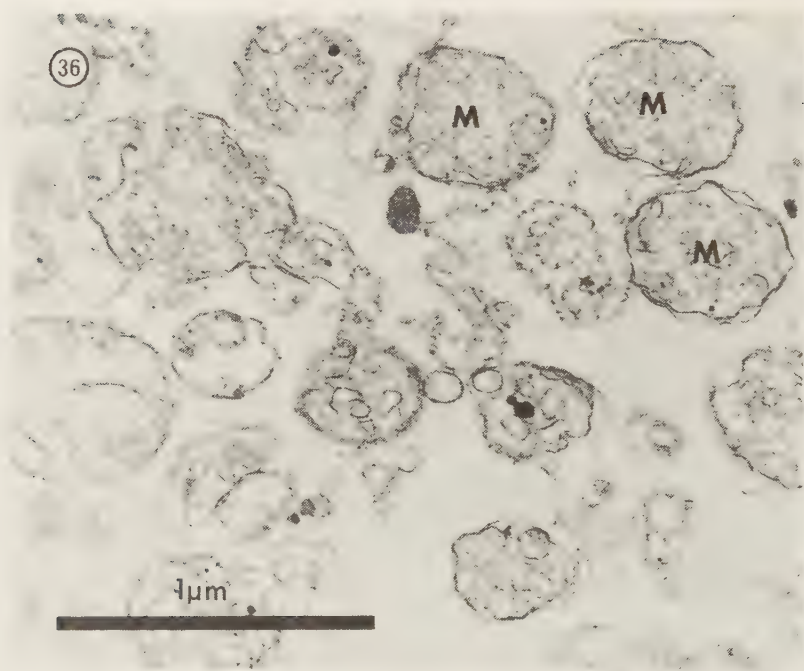


Abbildung 33

Percoll-Dichtegradient nach Zentrifugation mit Plastiden-Rohfraktion (A) und Percoll/PVP-Dichtegradient nach Zentrifugation mit Mitochondrien-Rohfraktion (B) aus *Dioscorea composita*. Die Plastiden (P) fanden sich bei einer Schwimmdichte von 1,085 g/ml; die Mitochondrien (M) bei 1,055 g/ml und die Peroxisomen (POX) bei 1,068 g/ml (Kalibrierung mit "marker beads" für Percoll).





Abbildungen 34 und 35

Plastidenfraktionen (Ultradünnschnitte, nachkontrastiert) aus R. serpentina (34) und D. composita (35). Die Plastiden (P) aus D. composita sind sehr klein (2 - 3 μ m), aber eindeutig charakterisiert durch ihre Stärkekörner (S), Plastoglobuli (PG) und Ferritin (Fe). Die Präparation aus R. serpentina enthält verschiedene, nicht näher definierbare Strukturen. Lediglich ein Mitochondrium (M) ist erkennbar.

Abbildungen 36 und 37

Mitochondrienfraktionen (Ultradünnschnitte, Nachkontrastiert) aus R. serpentina (36) und D. composita (37). Die Präparation aus D. composita ist einheitlich, die Präparation aus R. serpentina ist durch nicht näher definierbare Strukturen kontaminiert. Die Mitochondrien sind gut erhalten, wie an der doppelten Hüllmembran erkennbar ist.

wiederum durch unbekannte Partikel kontaminiert, die Mitochondrien waren in ihrer Struktur deutlich von denen aus Dioscorea composita (Abb. 37) unterschieden. Die Mitochondrienpräparation aus D. composita war einheitlich. Alle Ultradünnschnitte aus diesen Präparationen wurden nachkontrastiert und erlauben deshalb keine Aussage über den Gehalt an Blei-Präzipitaten.

Der Gehalt an PC und Blei wurde in den Fraktionen der Präparation mit biochemischen Methoden untersucht. Tabelle 15 stellt die Daten einer Aufarbeitung aus Dioscorea composita dar. Die elektronenmikroskopischen Bilder belegten die Reinheit der präparierten Fraktionen, deshalb kann aus den Daten dieser Tabelle abgeleitet werden, daß die reinen Organellpräparationen kein PC, aber signifikante Mengen Blei enthielten. Die in den Organell-Rohpräparationen (PA bzw. MA) festgestellten Gehalte an PC sind vermutlich durch in diese Fraktionen mitgeschleppte Reste des Cytosol-Überstandes verursacht. Für Dioscorea composita kann also auf eine Lokalisation des PC im löslichen, Cytosol-Kompartiment geschlossen werden, während die Daten aus R. serpentina nicht ausreichen, um einen definitiven Schluß zu ziehen. Die beiden Zellkulturen unterschieden sich in ihrer Ultrastruktur so

signifikant, daß aus der letzteren keine Präparation intakter Plastiden und nur eine deutlich von Dioscorea composita unterschiedene Mitochondrienfraktion erhalten werden konnte.

	Protein (mg)	Blei (μ mol)	Blei (Ausb.%)	PC * (μ mol)	PC * (Ausb.%)	Blei (nmol/mg Prot.)	PC * (nmol/mg Prot.)
Rohextrakt	1884.0	1868.1	100.0	373.8	100.0	1.0	0.2
Cytosol	1727.0	873.7	46.8	390.8	104.5	0.5	0.2
PA	100.0	282.4	15.1	2.5	0.7	2.8	0.0
MA	84.0	4.1	0.2	2.0	0.5	0.0	0.0
Plastiden	72.8	79.2	4.2	0.0	0.0	1.1	0.0
Mitochondrien	16.5	43.8	2.3	0.0	0.0	2.7	0.0
Peroxisomen	1.2	0.5	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0

Tabelle 15

Biochemische Daten der Organellenpräparation aus 1120 g (FG) Zellen aus Suspensionskultur von Dioscorea composita, die für 2 Tage während der frühen Wachstumsphase mit 1 mM Pb^{2+} belastet worden war. *: PC ist als Summe der in den einzelnen Monomeren enthaltenen Mengen Glu-Cys-Einheiten angegeben. PA = Plastiden-Auftragssuspension, MA = Mitochondrien-Auftragssuspension, erhalten aus differentieller Zentrifugation des Rohextrakts. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde mit "Cytosol" bezeichnet.

III.5: Stoffwechselphysiologische Untersuchungen mit ^{109}Cd -markiertem Phytochelatin

Wie in der Einleitung dargelegt wurde, ist Cd^{2+} wegen seiner guten Verfügbarkeit und mengenmäßig bedeutsamen Einschleusung in die Nahrungskette eines der relevantesten Umweltgifte. Akute Vergiftung mit Cd^{2+} äußert sich zum Beispiel in der in Japan aufgetretenen Itai-Itai (Aua-Aua)-Krankheit (Tsuchya, 1979). Den Hauptteil des Cd^{2+} , das der Mensch aufnimmt, führt er sich über die pflanzliche Nahrung zu (deHaan, 1975). Die Bindungsform, in der dieses Cd^{2+} vorliegt, ist für Aufnahme und Retention im belasteten Tier- oder Menschenkörper relevant (Grünhage et al. 1985). Nun muß grundsätzlich davon ausgegangen werden, daß in Pflanzen aufgenommenes Cd^{2+} in PC komplexiert vorliegt. Deshalb wurde im Folgenden untersucht, ob sich Aufnahme und Retention des Cd^{2+} in Versuchstieren verändern, wenn es statt als freies CdCl_2 in PC komplexiert verabreicht wird.

III.5.1: Austausch des in PC komplexierten ^{112}Cd gegen ^{109}Cd

Alle Arbeiten mit ^{109}Cd wurden im Institut für Nuklearbiologie der GSF, Neuherberg, in Zusammenarbeit mit den Herren Dr. W.E. Kollmer und Dr. D. Berg durchgeführt.

Aus Suspensionskulturen von R. serpentina isolierter Cd^{2+} -PC-Komplex wurde mit ^{109}Cd durch Isotopenaustausch markiert, wie Wagner (1984) es für den Schwermetall-bindenden Komplex aus Rotkohl beschrieben hatte. Das im Komplex gebundene Cd ließ sich innerhalb von Minuten gegen ^{109}Cd (γ -Strahler mit 80 keV, Halbwertszeit 453 Tage) durch einfaches Mischen in neutraler Lösung austauschen. Dazu wurde Cd^{2+} -PC-Komplex (27 mg, enthielt 4 mg Cd) in 2 ml 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 aufgelöst. $2\text{mCi } ^{109}\text{Cd}$ (87,7 mCi/ μmol ; also ca. 2,56 $\mu\text{g Cd/l/1562}$ des Cd im PC) in mit Tris-Base auf pH 7 eingestellter Lösung wurden hinzugefügt. Nach 30 min. bei Raumtemperatur wurde dieses Gemisch über Sephadex G-50 (0,8 x 30 cm, Fluß: 20 ml/h) chromatographiert. Fraktionen von 2 ml wurden aufge-

fangen und die Radioaktivität im β -Zähler bestimmt. Mehr als 99 % des eingesetzten radioaktiven Cd eluierten mit dem PC-Komplex.

III.5.2: Fütterung markierten Phytochelatins an Ratten

Das mit ^{109}Cd -markierte PC (10 ml mit 74 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ PC, 56 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ Cd) wurde gleichmäßig verteilt an 5 männliche, 14 Wochen alte Wistar Ratten des Stammes Neuherberg mit einer Magensonde oral appliziert. Die Ratten wurden einzeln in kontaminationssicheren Käfigen gehalten und die Radioaktivität zunächst 2 x täglich, nach 2 Tagen in größeren Abständen am Ganzkörperzähler verfolgt. Nach 3 Wochen wurden die Tiere getötet und einzelne Organe (Leber, Niere, Darm, Fell) präpariert und die darin enthaltene Radioaktivität bestimmt. 5 Kontrolltiere, die die gleiche Menge radioaktiven Cadmiums als CdCl_2 erhalten hatten, wurden parallel dazu untersucht. Abbildung 38 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

Die Graphen lassen sich in 2 Exponentialfunktionen aufgliedern. Während der ersten 3 Tage wird in einer raschen Ausschleusung über 99 % der applizierten Radioaktivität mit Urin und Kot wieder ausgeschieden. Danach schließt sich eine wesentlich langsamere Abnahme des Anteils der Radioaktivität an, der mit Cd^{2+} tatsächlich in die Körperorgane aufgenommen und gebunden worden war. Durch ein iteratives Näherungsverfahren ließ sich diesen Daten eine Exponentialkurve anpassen, aus der sich die Resorption bezogen auf die Zeit 0 sowie die biologische Halbwertszeit errechnen ließen.

Die Kontrolltiere resorbierten 0,15 % der applizierten Radioaktivität, die biologische Halbwertszeit wurde zu 106,6 Tagen errechnet. Die Tiere, die mit PC-komplexiertem Cd^{2+} belastet worden waren, resorbierten verglichen mit den Kontrolltieren mehr Radioaktivität: 0,35 % der applizierten Radioaktivität. Die biologische Halbwertszeit betrug im Gegensatz zu den Kontrolltieren nur 54,4 Tage. Neben diesem deutlichen Unterschied zeigten sich auch in der Verteilung

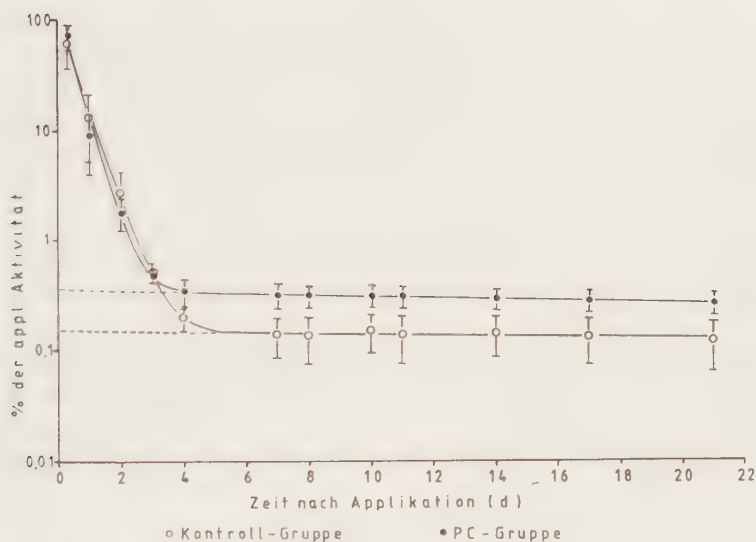


Abbildung 38

Ganzkörperretentionsmessung von ^{109}Cd , das Ratten als CdCl_2 (Kontrollen) oder als Cd^{2+} -PC-Komplex verabreicht worden war. Die Retentionskurve gibt, auf die Zeit = 0 extrapoliert, die Resorption an.

der Radioaktivität in den Organen, die nach dem Abtöten der Tiere präpariert wurden, Unterschiede zwischen den Kontroll- und PC-gefütterten Tieren. Aus Tabelle 16 kann man entnehmen, daß im Magen als Beispiel für ein von der Aufnahme des Cd^{2+} zunächst betroffenes Organ in den Kontrolltieren die Radioaktivität 7-fach erhöht war gegenüber den mit Cd^{2+} -PC-Komplex belasteten Tieren. Die Gehalte in der Leber unterschieden sich nicht signifikant, in den Nieren aber fand sich mehr Radioaktivität, wenn das Cd^{2+} in PC komplexiert verabreicht wurde, verglichen mit den Kontrollen, die freies Cd^{2+} erhalten hatten. Die Ergebnisse zeigen, daß die Komplexierung des Cd^{2+} in PC eine für den Körper gut verfügbare Bindungsform ist. Die geringere biologische Halbwertszeit hängt vermutlich nicht mit der Bindungsform, sondern mit der

	10 ⁻³ % der resorbierten Aktivität / g FG	
	PC-Gruppe	Kontrollgruppe
Magen	1,7 +/- 0,5	11,4 +/- 4,2
Leber	17,0 +/- 2,0	12,0 +/- 5,0
Nieren	69,0 +/- 5,0	39,0 +/- 7,0

Tabelle 16

Verteilung von ¹⁰⁹Cd in repräsentativen Organen von Ratten, die jeweils 250 µCi ¹⁰⁹CdCl₂ (Kontrollgruppe) oder PC-komplexiertes ¹⁰⁹Cd²⁺ erhalten hatten. Nach 21 Tagen Versuchsdauer wurden die Tiere (in jeder Gruppe 5) abgetötet und die Aktivität in den präparierten Organen gemessen. Die Mittelwerte der 5 Messungen +/- Standardabweichung sind angegeben.

erhöhten Resorption zusammen. In Fällen erhöhter Resorption wird allgemein eine beschleunigte Dekorporation beobachtet (Dr. W.E. Kollmer, persönliche Mitteilung).

III.5.3: Versuch der Dekorporation von ¹⁰⁹Cd aus Ratten

Um zu untersuchen, ob PC-Peptide in der Lage sind, bereits aufgenommenes und in Leber und Niere inkorporiertes Cd²⁺ wieder zu dekorporieren, wurden Versuchstiere - Ratten - durch Belastung mit Cd²⁺ vorbereitet. 20 männliche Wistar Ratten, Stamm Neuherberg, 16 Wochen alt bei Beginn des Versuchs, wurden mit 10 intraperitonealen Injektionen von Cd (spezifische Aktivität: 138 kBq/µmol, Menge pro Injektion: 370 kBq/2,68 µmol) bis zu einer Körperlast von 2 µg Cd/Kg mit 2242 kBq/Kg chronisch belastet. Das entspricht erfahrungsgemäß (Dr. D. Berg, pers. Mitteilung) 150 ppm Cd im Nierengewebe. Bei intraperitonealer Injektion ist die Retention des Cd²⁺ im Körper fast 100 % (Dr. D. Berg, pers. Mitteilung), so daß mit der Radioaktivität sparsam umgegangen werden konnte.

Zur Dekorporation des aufgenommenen Cd^{2+} wurden Gruppen zu je 5 Tieren gebildet, denen in 5 Dosen in 1-tägigem Abstand PC ebenfalls intraperitoneal verabreicht wurde. PC-Peptide wurden als metallfreier Ligand und im Vergleich dazu in mit Zn^{2+} komplexierter und damit vor Oxidation in der Blutbahn geschützter Form eingesetzt. Zur Kontrolle wurden zwei weiteren Gruppen der Tiere zum einen GSH als monovalenter Thiol-Ligand und zum anderen Thiol-freie Injektionslösung verabreicht. Die Substanzen wurden in jeweils gleichen Volumina (200 μl) phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und folgende Gehalte gemessen:

PC (metallfrei): 14,5 μmol SH, 0,04 μmol Cd, 0,06 μmol Zn

Zn^{2+} -PC (rekonstituiert): 12,5 μmol SH, 0,01 μmol Cd,

13,7 μmol Zn^{2+}

GSH: 8,5 μmol SH, Cd und Zn unter der Nachweisgrenze,
Kontrolle: alle Werte unter der Nachweisgrenze.

Die Lösungen wurden eingefroren aufbewahrt und an 5 aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal injiziert. Die Radioaktivität in den Tieren wurde täglich im Ganzkörperzähler verfolgt. Die Messungen wurden mit Hilfe einer Standard-Strahlungsquelle, die in die Tierhalterung eingespannt wurde, kalibriert; die Messungen wurden für den Zerfall des ^{109}Cd korrigiert und auf die anfänglich eingesetzte Radioaktivitätsmenge bezogen.

Die in den Tieren vorhandene Radioaktivität wurde jeweils vormittags über einen Zeitraum von 14 Tagen verfolgt. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 39: in allen 4 Versuchen wurde die gleiche biologische Halbwertszeit von ca. 100 Tagen festgestellt. Weder GSH noch PC waren intraperitoneal verabreicht in der Lage, den Cd^{2+} -Gehalt gegenüber der Kontrolle schneller zu erniedrigen.



Abbildung 39

Ganzkörperretentionsmessungen von ^{109}Cd in Ratten. Den Tieren waren in Gruppen zu je 5 Individuen zu den mit Pfeilen bezeichneten Zeiten Einzeldosen von PC, Zn-PC, GSH bzw. physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal verabreicht worden. Alle Meßwerte lagen innerhalb der durch Balken bezeichneten Bereiche.

Zur Kontrolle wurde wiederum nach dem Abtöten der Tiere die Verteilung der Radioaktivität in einzelnen Organen untersucht. Tabelle 17 stellt die Daten zusammen: Leber, Niere und Lunge zeigten in allen 4 Gruppen ähnliche Daten. Lediglich in den Nieren der mit PC in metallfreiem Zustand versetzten Tiere fand sich ein geringfügig erniedrigter Gehalt, verglichen mit den anderen Gruppen. Dies reflektiert jedoch keine beschleunigte Dekorporation, die Radioaktivität ist nur geringfügig anders verteilt.

Organ	% der resorbierten Aktivität/g FG			
	Kontrollen	GSH	PC	Zn-PC
Lunge	$\bar{x}$: 0,12 s_x : 0,006	0,13 0,011	0,11 0,007	0,11 0,008
Leber	$\bar{x}$: 5,01 s_x : 0,33	5,67 0,38	5,52 0,35	5,10 0,32
Nieren	$\bar{x}$: 9,05 s_x : 0,64	8,57 1,05	7,58 1,23	8,62 1,93

Tabelle 17

Verteilung von ^{109}Cd in repräsentativen Organen von Ratten, die nach Belastung mit ca. 1 ppm (in den Nieren: 150 ppm) ^{109}Cd intraperitoneale Injektionen von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrollen) bzw. gleiche Mengen (bezüglich der SH-Gruppen) an GSH, metallfreiem PC oder Zn-PC-Komplex erhalten hatten. Nach 14 Tagen Versuchsdauer wurden die Tiere (in jeder Gruppe 5) abgetötet und die Aktivität in den präparierten Organen gemessen. $\bar{x}$: Mittelwerte und s_x : Standardabweichungen aus den Messungen sind angegeben.

III.6 Glutathion-Biosynthese

Die Struktur der Phytochelatin- (PC) -Peptide mit den sich wiederholenden γ -Glutamylcysteinyl- (Glu-Cys) -Einheiten läßt einen Zusammenhang der enzymatischen PC-Synthese mit dem GSH-Stoffwechsel vermuten.

Grill et al. (1986 a) wiesen nach, daß nach Belastung mit Cd^{2+} von Kulturen von S. pombe zunächst PC2 synthetisiert wurde, während gleichzeitig GSH verbraucht wurde. Die Konzentration an PC2 durchlief ein Maximum, wie es für ein Zwischenprodukt einer mehrstufigen Enzymreaktion zu erwarten ist. Zu späteren Zeiten der Belastung wurde PC3 und schließlich PC4 angehäuft. An Suspensionskulturen von R. serpentina wurde ein entsprechender Verlauf der Synthese der PC-Peptide festgestellt (Grill et al. 1987). Diese Daten führten zu der Hypothese, daß PC aus GSH oder γ -Glutamylcystein (Glu-Cys) durch Kettenverlängerung am Aminoterminal mit Glu-Cys-Einheiten synthetisiert wird (Grill et al. 1986 a, 1987). Aufschluß über die Herkunft der carboxyterminalen Aminosäure des PC kann die Tatsache geben, daß auf Schwermetallbelastung hin in einigen Vertretern der Fabales, die Homogluthathion (hGSH) enthalten, Homologe des Phytochelatins, nämlich Homo-Phytochelatine (hPC) synthetisiert werden, die wie hGSH am Carboxyterminus β -Ala aufweisen. Bei Vorliegen eines Gemischs von GSH und hGSH in einigen anderen Vertretern der Fabales wird nach Belastung mit Cd^{2+} ein Gemisch von PC und hPC synthetisiert. Diese Zusammenhänge führen zu der Hypothese, daß der Carboxyterminus des PC von einem intakten GSH gebildet wird. Für den Nachweis des Einbaus intakter Moleküle GSH oder Glu-Cys in PC waren mehrfachmarkierte Peptidsubstrate nötig, die enzymatisch hergestellt werden mußten. Dazu war es Voraussetzung, die Enzyme γ -Glutamylcysteinsynthetase (EC 6.2.2.2, abgekürzt GS I) und Glutathionsynthetase (EC 6.2.2.3, abgekürzt GS II) zu präparieren. Für den Einsatz dieser Enzyme zur Präparation von unterschiedlich und spezifisch markierten Substraten kam es darauf an, die GS I und GS II voneinander abzutrennen, sowie

von anderen ATP-hydrolysierenden Enzymaktivitäten und GSH-abbauenden Enzymen (γ -Glutamyltranspeptidase, γ -Glutamylcyclotransferase) zu reinigen.

III.6.1: Enzymaktivitätsbestimmungen

Für die Reinigung der Glutathionbiosyntheseenzyme war es Voraussetzung, verlässliche Methoden zur Aktivitätsmessung zur Verfügung zu haben. In den ersten, als Vorversuche durchgeführten Enzymreinigungen (siehe Kap. III.6.3) waren nur sehr niedrige Aktivitäten gemessen worden. Die korrekte Enzymaktivitätsmessung der GS I und GS II stellte eine unerwartet schwierige Aufgabe dar, deren Lösung im Folgenden genauer erläutert werden soll. Zur Messung der Aktivitäten von GS I und GS II über die Bestimmung des Substratverbrauchs oder der Produktanhäufung gibt es viele verschiedene, aber ausnahmslos störanfällige Möglichkeiten. In den eigenen Experimenten wurde die Freisetzung des Phosphates aus ATP verfolgt, wie es von Gushima et al. (1983 b) und Mooz und Meister (1971) beschrieben worden war. Diese Methode hat den Vorteil des kleinstmöglichen Zeitbedarfs, ist aber für frühe Reinigungsstufen (Rohextrakt, 1. Ammoniumsulfatfällung) ungenau, da ATP unabhängig von der Peptidsynthese hydrolysiert wird und schon freigesetztes Phosphat und ADP die Glutathionbiosyntheseenzyme hemmen (Meister, 1985). Ein ATP-regenerierendes System (Phosphoenolpyruvat/Pyruvatkinase oder Phosphocreatin/Creatinkinase) verhindert die Produkthemmung durch freigesetztes ADP. In den Experimenten von Orlowski und Meister (1971) erhöhte dies die Aktivitätsmessung aber nur um 5%, dieser Befund wurde in eigenen Experimenten bestätigt.

Als Alternative kann das GSH mit dem zyklisierenden, enzymatischen Test nach Tietze (1969) hochspezifisch bestimmt werden, wie es von Gushima et al. (1983 b) durchgeführt wurde. Für die Messung der GS I auf diese Weise bedarf es einer Folgereaktion mit (vorher isolierter!) GS II und Gly zum GSH. Als Störung können vor allem in Rohextrakten andere

Enzymaktivitäten, die GSH verbrauchen, die Aktivitätsmessung verfälschen. Zudem wird die GS I durch GSH gehemmt (Orlowski und Meister 1971). Einen Ausweg bietet die Verwendung von α -Aminobuttersäure (ABA) statt Cys. Nach Seelig und Meister (1985) ist Ophthalminsäure, die sich vom GSH durch den Austausch des Cys gegen ABA unterscheidet, ein viel schwächerer Inhibitor der GS I. Ein weiterer Vorteil ist das Fehlen einer SH-Gruppe in ABA: diese Aminosäure wird nicht durch Luftsauerstoff oxidiert. (Die Oxidation von Cys und vor allem γ -Glutamylcystein (Glu-Cys) vermindert die wirksame Substratkonzentration rasch, nur reduzierte Substrate werden von GS I und GS II umgesetzt.) In einer Folgereaktion kann das Reaktionsprodukt γ -Glutamylaminobuttersäure (Glu-ABA) mit (vorher präparierter!) GS II weiter zu Ophthalminsäure umgesetzt und so die Aktivität bestimmt werden (Mooz und Meister 1971). Entsprechend wurde von Orlowski und Meister (1971) das analoge Glu-ABA statt Glu-Cys als Substrat für die GS II eingesetzt. Die Substrate wurden von den jeweiligen Enzymen mit der gleichen Geschwindigkeit umgesetzt wie Cys bzw. Glu-Cys, die KM-Werte waren etwas höher (Mooz und Meister, 1971; Orlowski und Meister, 1971). Watanabe et al. (1986) wiesen nach, daß auch die GS I aus E. coli außer Cys auch ABA als Substrat akzeptiert. Deshalb lag es nahe, für die Reihen-Enzymbestimmungen bei der Präparation von Gluthationsynthetasen aus E. coli das nicht-oxidable ABA und das einfacher als Glu-Cys herstellbare, ebenfalls nicht-oxidable Glu-ABA als Substrate einzusetzen. Tabelle 18 stellt Daten zusammen, die im Vergleich der verschiedenen Substrate mit und ohne Zugabe von DTE erhalten wurden. Mit Substraten, die im Vergleich Cys oder ABA enthielten, wurden im Rahmen der Meßgenauigkeit gleiche Ergebnisse erzielt. Mit den SH-haltigen Substraten waren aber höhere Konzentrationen an DTE nötig, um optimale Aktivität zu erzielen, da nicht nur das Enzym, sondern auch das Substrat reduziert gehalten werden muß. Besonders deutlich wird dieser Unterschied bei der GS II, das Substrat Glu-Cys ist besonders leicht oxida-

Substrat	GS I nkat/mg Protein		GS II nkat/mg Protein	
	ABA	Cys	-Glu-ABA	-Glu-Cys
mM DTE				
0	2,93	2,70	4,95	1,76
1	4,80	4,24	4,94	5,13
3	5,11	6,14	6,26	5,36
10	4,53	3,25	5,62	5,22

Tabelle 18

Abhängigkeit der Enzymaktivität von γ -Glutamylcysteinsynthetase (GS I) und Glutathionsynthetase (GS II) vom verwendeten Substrat und von der Reaktivierung durch das Reduktionsmittel Dithio-Erythrit (DTE). Je 0,2 mg Protein einer durch wiederholte Ammoniumsulfatfällung an GS I und GS II angereicherten Präparation aus *E. coli* wurden mit oxidablen Substraten (Cys, γ -Glu-Cys) und mit Substraten ohne SH-Gruppen (ABA: α -Aminobuttersäure, γ -Glu-ABA) 30 min. bei 37 °C in Standardansätzen inkubiert.

bel und lag auch nach Reinigung im reduzierten Zustand nach dem Gefriertrocknen in größtenteils oxidiertem Zustand vor. Wenn der Umsatz und die Identität des Reaktionsproduktes mit GSH mit dem enzymatischen Test nach Tietze (1969) verfolgt werden sollten, wurden deshalb die Substrate vor Beginn der Reaktion frisch mit Borhydrid reduziert. Das nach der Reaktion in den Lösungen vorhandene Borat störte die enzymatischen Umsätze nicht.

III.6.2: Genauigkeit und Nachweisgrenze der Aktivitätsbestimmung

In Vorversuchen wurde ermittelt, daß die eingesetzten Substratkonzentrationen (5 mM) unter den beschriebenen Bedingungen für (z. B. in Säuleneluaten) verdünnte Enzymlösungen Substratsättigung bedeuten. Um die Gültigkeit des Testsystems abschätzen zu können, wurde eine Kinetik der Enzymreaktion aufgenommen. Abbildung 40 zeigt das Ergebnis: mit

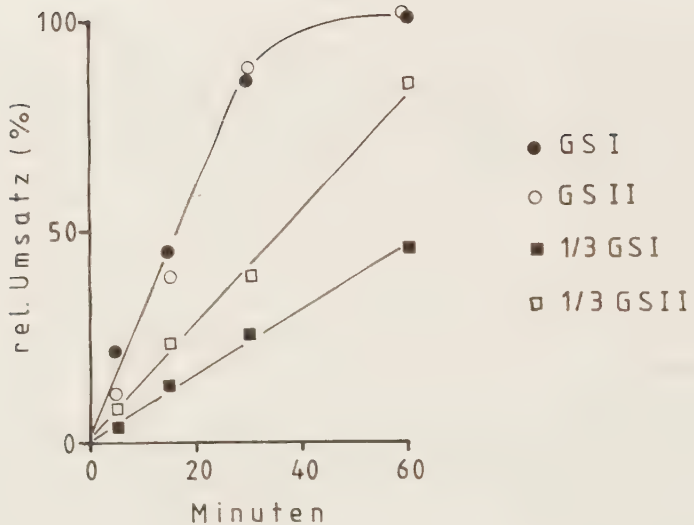


Abbildung 40

Zeitlicher Verlauf der Anhäufung des Reaktionsproduktes Phosphat bei der enzymatischen Synthese von GSH mit Enzymen aus *E. coli*. 100% Umsatz entsprachen 800 nmol freigesetzten Phosphats in einem Ansatz von 160 μ l. Eine durch Ammoniumsulfatfällung an Aktivität von γ -Glutamylcysteinsynthetase (GS I) und Glutathionsynthetase (GS II) angereicherte Präparation wurde unverdünnt (kreisförmige Symbole) und 1:3 verdünnt (quadratische Symbole) eingesetzt. Die beiden Enzymaktivitäten wurden durch den Einsatz geeigneter Substrate unterschieden (siehe Text).

den hier verwendeten Enzympräparationen war der Reaktionsverlauf über 1 h linear. Das bedeutet, daß die im Testsystem vorhandenen 5 mM Aminosäuren und 15 mM ATP Substratsättigung bedeuteten. War durch zu große Enzymaktivität die Messung ungenau und durch Erschöpfung der Substrate verfälscht (kreisförmige Symbole), konnte eine erneute Messung mit entsprechend verdünnten Enzymlösungen die genauen Werte liefern (rechteckige Symbole in Abb. 40). Nur Messungen, die die Testkapazität zu weniger als 70% ausnutzten, wurden verwendet. Theoretisch wäre das Testsystem bei einem Umsatz von 5 mM Substrat zu 5 mM GSH bzw. Glu-Cys erschöpft

gewesen. Das hätte bei einem Einsatz von 100 μl Enzympräparation bei 1-stündiger Inkubation in einen Testansatz von 160 μl einer Aktivität der Probe von 2,2 nkat/ml entsprochen. Im Phosphattest (50 μl von 200 μl abgestopptem Testansatz wurden eingesetzt) hätte die dabei freigesetzte Phosphatmenge eine Absorption von 0,8 A_{570} hervorgerufen (das entspricht 200 nmol Phosphat). Die Nachweisgrenze der Phosphatbestimmung war 10 nmol Phosphat, das entspricht 100 pkat/ml Aktivität in der Probe (bei 1 h Inkubation). Alle Enzymaktivitätsbestimmungen wurden um den Meßwert einer parallel mitinkubierten Probe im Standardansatz, jedoch ohne Aminosäuren, korrigiert.

Mit der enzymatischen Glutathionbestimmung nach Tietze (1969) ließ sich die Aktivität über das gebildete GSH noch empfindlicher verfolgen und gleichzeitig die Identität des Reaktionsproduktes nachweisen. Die Nachweisgrenze der GSH-Bestimmung war 100 pmol GSH, diese Menge in 10 μl des abgestoppten Glutathionsynthetase-Testansatzes entsprach einer Aktivität von 5,6 pkat/ml Probe. 100 % Umsatz hätte im nach 1 h Inkubation abgestoppten Testansatz einer Konzentration von 4 mM GSH entsprochen, das entspricht 2,2 nkat/ml Probe. Die Reaktionslösung mußte zur Messung dieser GSH-Menge verdünnt werden. Die GSH-Bestimmung lieferte nur mit innerer Standardisierung durch Zufügen von 1 nmol GSH verlässliche Werte.

III.6.3: Enzympräparation aus E. coli

Ausgangsmaterialien und Reinigungsmethoden für diese Enzyme sind in der Literatur beschrieben. Mooz und Meister (1971) reicherten GS I aus Schweineleber 134-fach an, bei 7 % Ausbeute. Orlowski und Meister (1971) beschrieben Rattennieren als die reichste Quelle für GS I und reicherten das Enzym 40-fach an, mit einer Ausbeute von 36%. Die GS II wurde zuerst von Johnston und Bloch (1951) aus Leber, dann von Snoke (1955) und später von Mooz und Meister (1971) aus Bäckerhefe isoliert. Das Enzym wurde 5000-fach gereinigt,

bei einer Ausbeute von 2,6 %. Von Meister (1985) wurde auch die Reinigung von GS II aus Rattennieren beschrieben, das Enzym wurde 750-fach gereinigt bei 39 % Ausbeute.

Beide Enzyme können also aus demselben Ausgangsmaterial: Nierengewebe, das aus den in den Versuchen des Kapitels III. 5 verwendeten Tieren zur Verfügung stand, erhalten werden. In einem Vorversuch wurden die beiden Enzyme, GS I und GS II, nach den Vorschriften von Orlowski und Meister (1971) und Meister (1985) daraus angereichert. Die zur Verfügung stehenden Materialmengen waren sehr gering (20 g Nierengewebe), die Ausbeute an Enzymaktivität war dementsprechend klein (50 nkat). Die Enzymaktivitätsbestimmung war in diesem Versuch noch nicht optimiert und lieferte möglicherweise zu niedrige Werte. Zum Vergleich: Meister (1985) isolierte aus 150 Ratten (das entspricht 75 kg Lebendgewicht!) 350 g Nieren und daraus nur 12 mg Enzymprotein mit 9900 U Aktivität. Auch für die Präparation der GS II aus Saccharomyces cerevisiae war nur eine sehr geringe Aktivitätsausbeute zu erwarten: aus 76 l autolysierbarer Hefe (380 l Rohextrakt) wurden von Mooz und Meister (1971) 40 mg Enzymprotein mit 13000 U Aktivität erhalten. Solche Materialmengen standen nicht zur Verfügung und wären unter den obwaltenden Umständen nicht zu verarbeiten gewesen.

Einen Ausweg bot die Möglichkeit, die Enzyme der GSH-Synthese aus einem Stamm von E. coli (E. coli C 600 mit Plasmid pGS 500, Gushima et al. (1983 a)) zu isolieren, der diese Enzyme überexprimiert. Gushima et al. (1983 b) hatten die GS II aus diesem Organismus bei 8,5 %iger Ausbeute 60-fach angereichert. Die GS I wurde von Watanabe et al. (1986) aus dem gleichen Stamm von E. coli isoliert. Das Temperaturoptimum (45°C) und pH-Optimum (pH = 8,5) waren für beide Enzyme gleich, ebenso wie das optimale Verhältnis von Mg^{2+} zu ATP von 2. Dieser Stamm (E. coli C 600 mit Plasmid pGS 500) wurde beschafft und daraus nach der Vorschrift von Gushima et al. (1983 b) die GS II, beziehungsweise nach der Vorschrift von Watanabe et al. (1986) ohne die abschließende

Affinitätschromatographie die GS I isoliert. Dabei wurde festgestellt, daß die beiden Aktivitäten durch die in den Vorschriften beschriebenen Ammoniumsulfatfällungen (56/77 %; 35/62 % für GS I; 30/60 %; 35/60 % für GS II) nicht voneinander abgetrennt wurden. Deshalb wurde zunächst für beide Enzyme gemeinsam aus einem Rohextrakt von 20 g (FG) in Gegenwart von 20 mg/l Chloramphenicol gewachsener Zellen der Rohextrakt durch Aufschließen im Glasperlenhomogenisator hergestellt und die wiederholte Ammoniumsulfatfällung: 1. 30/70 %; 2. 35/60 % Sättigung für beide Enzyme gemeinsam durchgeführt. Erst danach wurden die beiden Präparationen für GS I und GS II getrennt. Besser noch als an der in der Vorschrift zur Ionentauschchromatographie verwendeten DEAE-Zellulose ließen sich die Enzyme an QAE-Sephrose FF (Pharmacia) bei pH = 7 trennen. Abbildung 41 zeigt ein Elutionsprofil der QAE-Ionentauschchromatographie. Aufgetragen worden war die dialysierte Enzympräparation nach der 2. Ammoniumsulfatfällung. Im Eluat dieser Säule wurden nur noch geringe Mengen von nicht mit GS I oder GS II korrelierter ATPase-Aktivität gefunden, die fast völlig von den interessierenden Enzymen abgetrennt wurde. Die Fraktionen mit der jeweils höchsten Aktivität wurden vereinigt und durch Ultrafiltration eingengt, um das für die anschließende Gelfiltration nötige kleine Volumen (6 ml) einzustellen. Das Auflösungsvermögen von Säulen mit Sephadex G-150 bzw. G-200, wie sie die Autoren (Gushima et al., 1983 b; Watanabe et al. 1986) zur Gelfiltration verwendet hatten, wird übertroffen von HPLC-Gelfiltration mit Kieselgelsäulen (Fraktogel TSK). Die Fraktionen aus der Ionentauschchromatographie mit hauptsächlich Aktivität an GS I bzw. GS II wurden auf der HPLC-Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Abbildung 42 zeigt jeweils ein Beispiel für Elutionsprofile dieser Trennungen. Die Säule war mit Standardproteinen zur Bestimmung von apparenten Molekulargewichten (M_r) kalibriert worden (Frenzel 1987). Die Aktivität von GS I eluierte entsprechend einem M_r von 60 kDa, das entspricht im Rahmen der Versuchsgenauigkeit dem von Watanabe et al. (1986) beschriebenen M_r von 55 kDa.

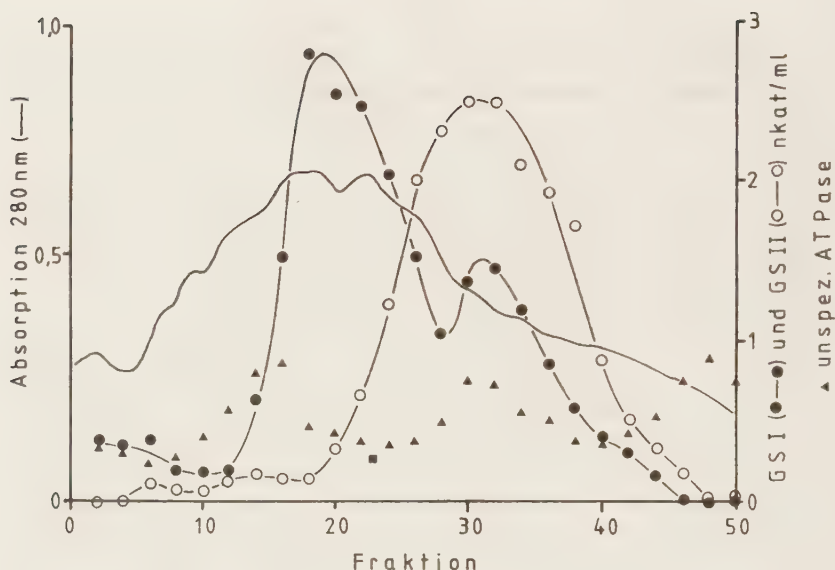


Abbildung 41

Elutionsprofil der Ionenauschromatographie an QAE-Sepharose einer durch Ammoniumsulfatfällung vorgereinigten Präparation mit Aktivität von γ -Glutamylcysteinsynthetase (GS I) und Glutathionsynthetase (GS II) aus *E. coli* C 600 pGS 500. Aufgetragen wurden 26,6 mg Protein mit 561 nkat GS I und 350 nkat GS II. Die Fraktionen mit der jeweils höchsten Aktivität an GS I und GS II wurden gesammelt und durch Ultrafiltration eingengt. Unspezifische (nicht von Aminosäuresubstraten abhängige) ATPase-Aktivität wurde z. Teil abgetrennt.

In Abbildung 42 ist ferner zu erkennen, daß die Aktivität der GS II in zwei getrennten Maxima eluierte. Die diesen beiden Maxima zuzuordnenden M_r von 180 kDa bzw. 40 kDa entsprechen in etwa den von Gushima et al. (1983 b) beschriebenen M_r von 152 kDa für das Tetramer bzw. 38 kDa für das Monomer des Enzyms. Möglicherweise führte der gegenüber der Literaturvorschrift stärker saure pH (6,2 statt 7,5) zur Auftrennung in die Untereinheiten. Das Säulenmaterial (Kieselgel statt Dextrangel) und der Puffer (Morpholino-Ethansulfonsäure statt Tris) stellen gegenüber der Literaturvor-

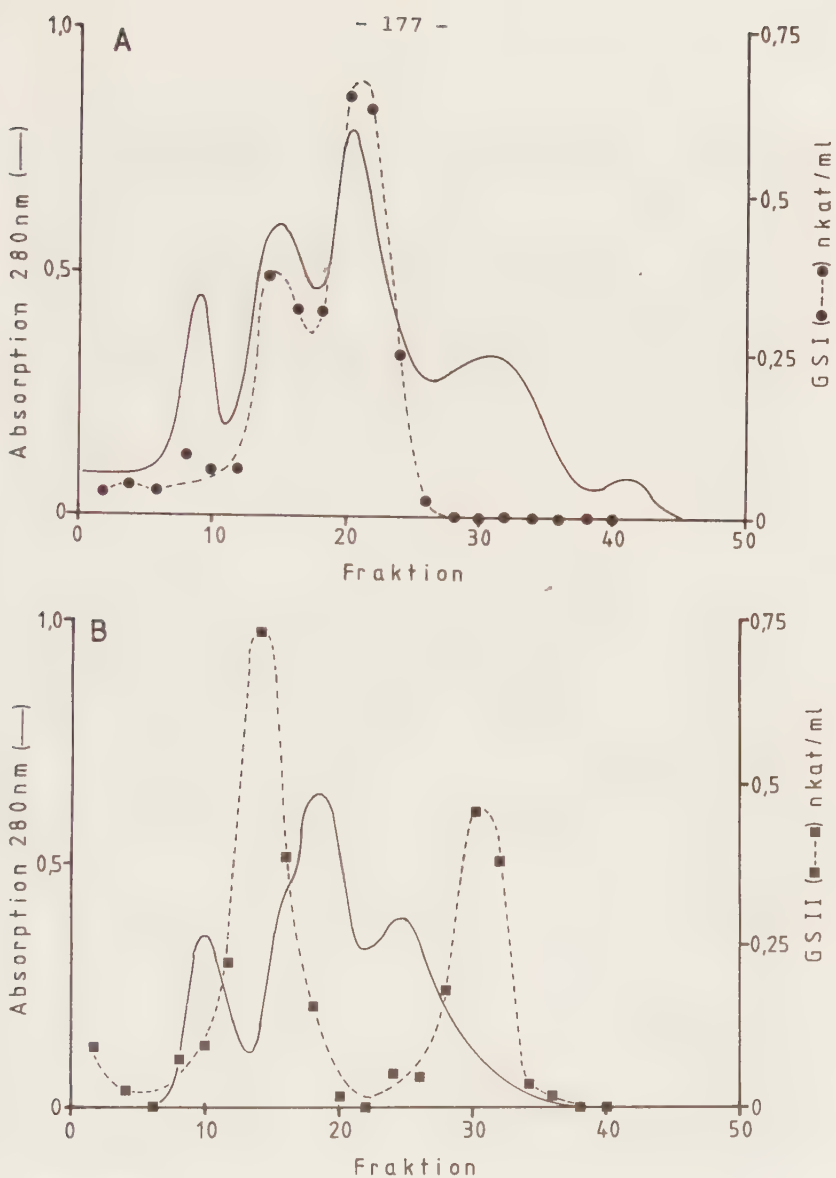


Abbildung 42

Elutionsprofile der Gelpermeations-HPLC von Präparationen mit Aktivität von GS I (A) und GS II (B) aus *E. coli* C 600 pGS 500, die durch Ionentauschchromatographie vorgereinigt worden waren (siehe Abbildung 40). Aufgetragen wurden A: 3 mg Protein mit 332 nkat GS I und 42,5 nkat GS II, und B: 4 mg Protein mit 62 nkat GS I und 184 nkat GS II. In B entspricht die zuerst eluierende Aktivität einem M_r von 180 kDa (tetrameres Enzym), die später Eluierende einem M_r von 40 kDa (monomeres Enzym). Das Elutionsvolumen der GS I entspricht einem M_r von 60 kDa.

schrift veränderte Bedingungen dar, die eine geringfügig veränderte Bestimmung des apparenten Molekulargewichts bewirken können.

Mit beiden Chromatographietechniken (Ionentauschchromatographie und Gelfiltration) wurden die Proteine in scharfen Maxima getrennt, die Aktivitäten eluierten aber über weite Bereiche verteilt. EDTA oder Trägerprotein (Rinderserumalbumin), die beim Zellaufschluß zugegeben worden waren und den Abbau von Enzymprotein durch Proteasen verhindern sollten, veränderten dieses Elutionsverhalten nicht. Der Reinigungseffekt war deshalb gering. In Tabelle 19 sind die Daten

Fraktion	Protein (mg)	GS I			GS II		
		(nkat)	Ausb.(%)	Anr.	(nkat)	Ausb.(%)	Anr.
Rohextrakt	600	3480	100	1	2160	100	1
(NH₄)₂SO₄-Fällung 30/70% Sat.	125	991	28,5	1,4	892	41,3	2,0
35/60% Sat.	26,6	561	16,1	3,6	350	16,2	3,7
Hitzenat.	18,2	480	13,8	4,6	280	13,0	4,3
QAE-Sephrose Fraktion I	3,0	332	9,5	19,1	(42,5)	(2)	
Fraktion II	4,0	(62)	(1,8)		184	8,5	12,8
Gelfiltration Fraktion I	1,5	80	2,3	9,1	(17)	(0,8)	
Fraktion II	3,4	(12,6)	(1,2)		187	8,7	15,3

Tabelle 19

Anreicherung von γ -Glutamylcysteinsynthetase (GS I) und Glutathionsynthetase (GS II) aus *E. coli* C600 pGS 500. Der Rohextrakt wurde aus 20 g (FG) Zellen erhalten, die 36 h mit 20 mg/l Chloramphenicol gewachsen waren. Bei den (NH₄)₂SO₄-Fällungen wurde das Präzipitat bei der jeweils ersten rel. Sättigung verworfen, das Präzipitat der zweiten rel. Sättigung dialysiert und weiterverarbeitet. Mit 1/10 der Präparation wurde der Hitzenaturierungsschritt durchgeführt und die Ergebnisse hochgerechnet. Der Rest der Präparation wurde direkt durch Ionentauschchromatographie weitergereinigt.

einer Präparation von GS I und GS II aus 20 g (FG) Zellen von E. coli C 600 pGS 500 dargestellt. Man erkennt, daß die Hauptmenge an Protein bei den Ammoniumsulfatfällungen entfernt wurde und die beste Auftrennung zwischen den beiden Enzymaktivitäten mit der Ionentauschchromatographie an QAE-Sepharose erzielt wurde. Die Hauptmenge an nicht mit der Glutathionsyntheseaktivität korrelierter ("unspezifischer") ATPase-Aktivität wurde mit den Ammoniumsulfatfällungen abgetrennt, der Rest in der Ionentauschchromatographie entfernt (Abbildung 41).

Der in der Tabelle angegebene Hitzeschritt wurde nur mit einem Zehntel der Präparation durchgeführt, die Daten wurden auf die Gesamtmenge der Präparation hochgerechnet. Aus diesem Abschnitt der Tabelle 19 geht hervor, daß mit Hitzedenaturierung keine signifikante Anreicherung der Enzymaktivität zu erreichen war. Einmal erhitzte Enzympräparationen waren sehr viel instabiler als solche, die ständig bei 4°C gehalten worden waren. Deshalb wurde dieser Schritt vermieden und die durch Ionentauschchromatographie vorgereinigten Präparationen direkt mit Gelfiltrations-HPLC weiterbearbeitet. Mit dieser Methode konnte nur die Aktivität der GS II noch geringfügig angereichert werden. Bei der GS I traten in diesem Reinigungsschritt deutliche Aktivitätsverluste ein, die den durch Abtrennung von Protein erzielten Reinigungserfolg zunichte machten. In Kontrollversuchen zeigten beide Enzyme, die für die Dauer der Gelfiltration beim selben pH inkubiert wurden, keinen Aktivitätsverlust. Möglicherweise war der in der HPLC neben dem relativ sauren pH (6,2) zusätzlich nötige hohe Druck (20 bar) für die Aktivitätsverluste verantwortlich. In verdünnten Lösungen waren die Enzyme sehr wenig stabil. Die zur Konzentrierung eingesetzten Methoden der Ultrafiltration an einer Amicon PM-10-Membran und Gefriertrocknen hatten ebenfalls deutliche Einbußen an Enzymaktivität zur Folge. Deshalb wurde für die weiteren, für die Substratpräparation nötigen Enzymisolierungen nur die Schritte Ammoniumsulfatfällung und QAE-Ionentauschchromatographie durchgeführt.

matographie eingesetzt. Auch die Konzentrierung nach der Ionentauschchromatographie wurde durch Ammoniumsulfatfällung (60% Sättigung) erreicht. Damit konnte GS I in ca. 9%iger Ausbeute bei 20-facher Anreicherung und GS II bei 8%iger Ausbeute in 13-facher Anreicherung gewonnen werden. Die Präparationen waren frei von "unspezifischer" ATPase-Aktivität und erwiesen sich zur Synthese spezifisch markierter Peptide geeignet (Kap. III.6.6).

III.6.4: Identität der enzymatisch hergestellten Produkte

Vor einem Einsatz der aus E. coli präparierten Enzyme zur Synthese spezifisch markierter Peptidsubstrate mußte nachgewiesen werden, daß es sich bei den Reaktionsprodukten wirklich um die gewünschten Peptide handelt. Dazu wurde die Identität und Menge des Reaktionsproduktes aus Ansätzen mit Glu-Cys bzw. Cys mit der enzymatischen GSH-Bestimmung nach Tietze (1969) analysiert. Dazu wurden die Reaktionsansätze (160 µl) zum Test der GS I nach der Reaktionszeit von 1 h durch Zugabe von 40 µl 20% TCA abgestoppt, um dann erneut mit ATP, Gly und (vorher präparierter) GS II versetzt zu werden. Nach erneuter Reaktion wurde wieder abgestoppt und das gebildete GSH gemessen. Die in diesem Testsystem eingesetzte Glutathionreduktase setzt hochspezifisch nur GSH (und hGSH, Carnegie 1963)) um. Glu-Cys und Cys, aber auch Homocystein und Asparthion (Austausch des Glu im GSH gegen Asp) werden von Glutathionreduktase nicht als Substrate akzeptiert (Conn und Vennesland 1951).

III.6.5: Optimierung der Reaktionsbedingungen

Da die Enzyme zum Herstellen von radioaktiven Peptiden mehrmals über einen längeren Zeitraum gebraucht wurden, und außerdem die Substrate möglichst effektiv umsetzen sollten, mußten optimale Reaktionsbedingungen erarbeitet werden und die Stabilität der Enzympräparationen überprüft werden.

Die Enzyme verloren bei Einfrieren oder Dialyse rasch an Aktivität, auch die Aufbewahrung in Mercaptoethanol-haltigen Puffern inaktivierte die Enzyme. Das hatten auch Orlowski und Meister (1971) von der GS I berichtet. Auch während der Präparation ohne Oxidationsschutz nahm die Aktivität rasch ab. Eine Reaktivierung vermutlich oxidiertter GS II war durch Inkubation mit 5 mM DTE in Gegenwart von 1% Rinderserumalbumin möglich, gereinigte Enzympräparationen wurden durch Zugabe von DTE ohne gleichzeitigen Schutz durch Trägerprotein (Rinderserumalbumin) gehemmt (Wendel et al. 1975). Eine auf diese Weise reaktivierte Enzympräparation verlor ihre Aktivität rasch (innerhalb von 2 Tagen) und ließ sich nicht erneut reaktivieren (Wendel et al. 1975, Meister 1985). Dies und die Tatsache, daß SH-Reagentien die Enzyme hemmen, wurde dahingehend interpretiert, daß eine (oder mehrere) für die Aktivität essentielle SH-Gruppe(n) während der Präparation oxidiert wird und für die Stabilität wichtige Disulfidbrücke(n) bei der Reduktion aufgehoben wird/werden (Wendel et al. 1975, Meister 1985).

Zugegebenes Fremdprotein moderiert die Wirkung des Reduktionsmittels DTE, auf das die Enzyme sehr empfindlich reagieren. Deswegen wurde die Abhängigkeit des Umsatzes in Abhängigkeit von der Zugabe von DTE bei Anwesenheit von Rinderserumalbumin als Schutzprotein untersucht. Abbildung 43 zeigt das Ergebnis. Die reaktivierte Enzymaktivität bei 1 h Reaktionsdauer zeigt ein deutliches Optimum bei 3 mM DTE. Die Reaktivierung durch Oxidation inaktivierter Enzyme wird durch die bei höheren Konzentrationen an DTE auftretende Reduktion für die Stabilität essentieller Disulfidbrücken trotz der Zugabe von Rinderserumalbumin zunichtegemacht.

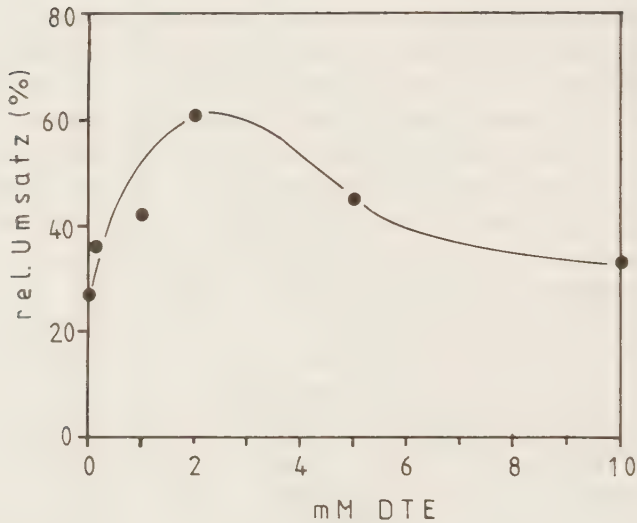


Abbildung 43

Optimierung der Bedingungen zur Glutathionsynthese (Gesamtreaktion mit GS I und GS II) mit Enzympräparationen aus *E. coli*. Die Ansätze wurden mit 1% BSA und steigenden Mengen DTE versetzt. Die Reaktion wurde anhand der Freisetzung von Phosphat aus ATP verfolgt. 1600 nmol Phosphat entsprechend 800 nmol GSH im Ansatz von 160 μ l entsprachen 100% Umsatz.

III.6.6: Präparation radioaktiv markierter Peptide

Zur Verwendung als Biosynthesesystem für radioaktiv markiertes GSH hatten Silbernagl *et al.* (1978) die beiden Enzyme GS I und GS II aus Rindererythrocyten an Glasfasern immobilisiert. Durch eine Säule mit den immobilisierten Enzymen wurde die Substratlösung mehrere Stunden zyklisiert. Die eigenen Enzympräparationen aus *E. coli* wurden deshalb in analoger Weise an silanisierten Glasperlen immobilisiert. Zum Betrieb einer Säule mit diesen Glasperlen analog der Methode von Silbernagl *et al.* (1978) war ein relativ großes Volumen (mindestens 2 ml), durch eine Pumpe umgewälzt, nötig.

Für einen Ansatz mit den in den Optimierungsversuchen eingesetzten Konzentrationen (um 5 mM) an Aminosäuren hätten aber sehr große Radioaktivitätsmengen eingesetzt werden müssen, um eine hohe spezifische Markierung zu erzielen. Für ^{14}C -Gly z. B., das die geringste spezifische Aktivität der verwendeten Substrate aufwies (250 Ci/mol), hätte das 2,5 mCi im Syntheseansatz bedeutet. Die für die Fütterungsversuche (siehe Kap. III.7) benötigten geringeren Radioaktivitätsmengen, die einen entsprechend geringeren Sicherheits- und Kostenaufwand bedeuteten, hätten in dem Säulensystem eine wesentlich verdünnte Substratlösung erfordert. Es stellte sich heraus, daß verdünnte (unter 1 mM) oder in stark unterschiedlicher Konzentration (zur Beeinflussung des Gleichgewichts) eingesetzte Substrate nur sehr geringfügig umgesetzt wurden. In einem kleineren Volumen (ca. 200 μl), mit einer geringen Menge der mit Enzymen beladenen Glasperlen in einem Eppendorf-Gefäß im Rotationsmischer zeigte der Ansatz aber ebenfalls unbefriedigende Umsatzergebnisse. Auch die Ausbeute der Immobilisierung (9 % für die GS I und 17 % für die GS II) war nur gering.

Als Ausweg blieb deshalb nur, frische Enzympräparationen in kleinen Volumina mit relativ hohen Konzentrationen auch der markierten Aminosäure zu inkubieren. Auch in den Standardansätzen zur Messung der Enzymaktivität konnte das Gleichgewicht der Reaktion nicht durch eine z. B. 100-fach höhere Konzentration an unmarkierten Aminosäuren in die gewünschte Richtung verschoben werden. Die Synthese radioaktiv markierter Substrate wurde deshalb in 160 μl -Reaktionsansätzen mit 5 mM Aminosäuren, 2,5 mM markierter Aminosäure und 15 mM ATP (wie zur Aktivitätsmessung) durchgeführt. Damit konnten die für besonders hohe spezifische Markierung notwendigen Radioaktivitäten verantwortet und eingesetzt werden.

Zur Vereinfachung der wiederholt erforderlichen Präparation radioaktiv markierter Peptide war es wünschenswert, die Enzympräparationen längere Zeit ohne Aktivitätsverlust aufbewahren zu können. Die Immobilisierung an Glasperlen er-

füllte zwar diese Anforderung, kam aber wegen der geschilderten Schwierigkeiten nicht in Frage. Die Aufbewahrung als ausgefälltes Protein in Gegenwart von 60 % Sättigung an Ammoniumsulfat und je 1 mM der Substrate beschränkte die Aktivitätsverluste im Vergleich zur Gefrieretrocknung, Aufbewahrung bei -20°C und Aufbewahrung bei 4°C in gelöster Form auf ein tolerierbares Maß. Nach 2 Monaten war so die Aktivität noch zu 90% erhalten.

Die Ammoniumsulfat-gefällten Enzympräparationen wurden kurz vor Gebrauch abzentrifugiert, der Niederschlag frisch in Puffer ohne Substrate, aber mit Reduktionsmittel (1 mM DTE + 1% Rinderserumalbumin) aufgenommen, über kleine Gelfiltrationssäulen entsalzt und die Enzyme frisch eingesetzt. Auf diese Weise wurden die zur Stabilisierung zugefügten Substrate, DTE, durch Proteaseverdau eventuell freigewordene Aminosäuren und GSH, das an Protein-SH-Gruppen als gemischtes Disulfid gebunden war, von den durch Reduktion gleichzeitig reaktivierten Enzymen abgetrennt. Die Enzympräparationen wurden jeweils vorher mit unmarkierten Substraten auf ihre Aktivität untersucht und die Reaktion mit den markierten Substraten dann entsprechend lange (1 - 3 h) inkubiert.

Der Fortschritt der Reaktion wurde durch Dünnschichtchromatographie verfolgt. Zwei Beispiele solcher Chromatogramme sind in Abbildung 44 dargestellt: man erkennt, daß bei Markierung mit ^{14}C -Gly ein 100 %iger Einbau in eine mit authentischem GSH cochromatographierende Substanz erfolgte. Bei Einsatz von ^{35}S -Cys war dieser Umsatz auch bei verlängerter Reaktionsdauer und erhöhter Enzymmenge nicht vollständig, sondern maximal 70 %. Die Identität der Reaktionsprodukte wurde wiederum mit dem enzymatischen Test nach Tietze (1969) verfolgt. Da die Reaktionsprodukte (GSH bzw. Glu-Cys) noch mit unumgesetzten unmarkierten Aminosäuren, Puffersalzen und ATP/ADP kontaminiert waren, wurden die Präparationen über HPLC gereinigt. Die Fraktionen, die während der Retentionszeit des GSH eluierten und radioaktiv markiert waren, wurden gesammelt und gefriergetrocknet. In

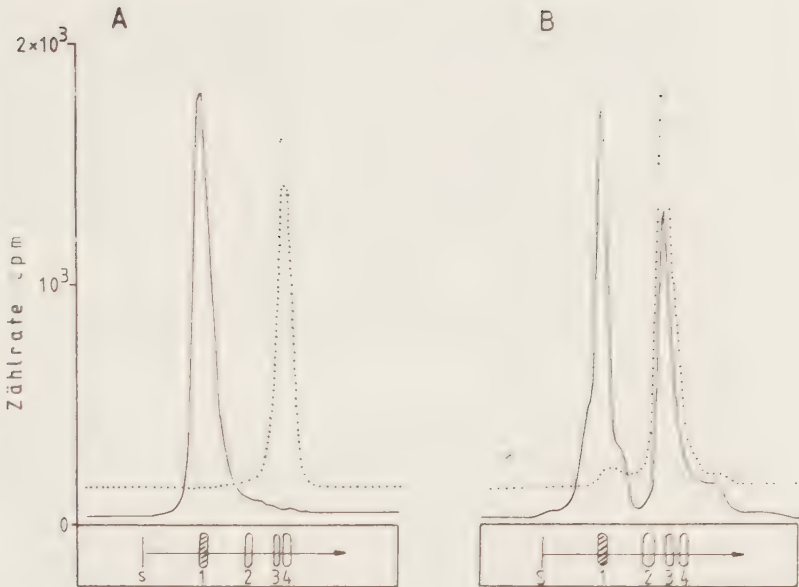


Abbildung 44

Dünnschichtchromatographie von peracetylsäureoxidierten Peptiden am Ansatz zur enzymatischen Synthese radioaktiv markierter Glutamins. Aufgetragen wurden Proben aus 1 µl der Enzymansätze entsprechend 5 nmol Aminosäuren und A: 0,3 µCi ^{14}C -Gly bzw. B: 1,27 µCi ^{35}S -Cys. In unterem Teil der Zeichnungen ist die Detektion mit Ninhydrin-Reagens schematisch wiedergegeben. S = Start, 1 = GSH, 2 = Glu, 3 = Cys, 4 = Gly. Der Pfeil gibt die Chromatographierichtung an. Darüber sind die Radioaktivitätsprofile bei Start (gepunktet) und nach Beendigung der Reaktion angegeben.

diesem Zustand konnten die markierten Substrate ohne Verlust aufbewahrt werden. Das Ergebnis für verschiedene Präparationen stellt Tabelle 20 zusammen. Da die radioaktiven Substrate nur in der halben Molariatät der unmarkierten Substrate eingesetzt worden waren (2,5 vgl. mit 5 mM), entsprechen (im abgestoppten Ansatz von 200 µl) 2 mM (400 nmol) GSH 100 % Umsatz. Die mit enzymatischer GSH-Bestimmung gewonnenen Daten stimmen gut mit den aus den Verteilungen der Radioaktivität ermittelten Umsatzraten überein.

Einsatz Substrat(μCi)		Produkt	Enzymat. Best.		Radioaktivität		
			nmol	%U	%E	(μCi)	%A
³ H-Glu	100	GSH	244	61	95	75	75
³⁵ S-Cys	200	GSH	210	52	58	94	47
¹⁴ C-Gly	50	GSH	390	97	100	57	100
³ H-Glu	100	GC	30	7	53	18	18
Nachreaktion*:			168	42			
³⁵ S-Cys	200	GC	24	6	52	64	32
Nachreaktion*:			144	36			

Tabelle 20

Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren in GSH bzw. Glu-Cys (GC). Je 400 nmol der markierten Aminosäure und 800 nmol der unmarkierten Aminosäuren wurden mit je 5 nkat GSI und GSII 1 h bei 37°C inkubiert. Durch DC der perameisensäureoxidierten Peptide aus 1 μl der Ansätze und Ausmessen des Radioaktivitätsprofils wurde die Einbaurrate (%E) bestimmt. Nach der Reinigung durch HPLC wurde mit dem enzymatischen Test nach Tietze (1969) das GSH bestimmt und die Umsatzrate (%U) ermittelt (400 nmol entspricht 100% Umsatz). *: GC wurde nach erneuter Reaktion mit GS II und Gly als GSH bestimmt. Die Radioaktivität in den gereinigten Produkten wurde im Scintillationszähler gemessen. Die Ausbeute (%A) bezogen auf die eingesetzte Radioaktivitätsmenge ist angegeben.

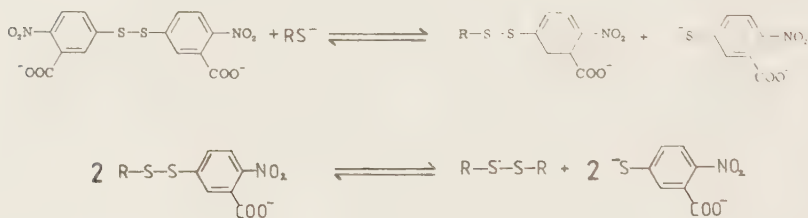
Die zum Nachweis des Einbaus intakter Moleküle GSH und/oder Glu-Cys in PC nötigen mehrfachmarkierten Peptide konnten nicht in der gewünschten Weise synthetisiert werden. Bei Einsatz mehrerer markierter Aminosäuren mußten diese in gleicher Konzentration eingesetzt werden, um einen gleichmäßigen Einbau zu erzielen. Die Möglichkeit der Beeinflussung des Gleichgewichts der Reaktion und damit der Umsatzrate entfällt damit. Die stark unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten der mit verschiedenen Isotopen markierten Aminosäuren machten es nötig, ³⁵S-Cys 1000fach und ³H-Glu 10fach mit unmarkierten Aminosäuren zu verdünnen, um gleiche spezifische Aktivitäten zu erhalten und gleichzeitig die für die enzymatische Synthese nötigen Konzentrationen einzustellen. Wenn man davon ausgeht, daß die radioaktiven Isotopen in den kommerziellen Produkten trägerfrei vorhanden waren, so wäre

nur jedes 10. (^3H -Glu/ ^{14}C -Gly) bzw jedes 1000. (^{35}S -Cys-/ ^{14}C -Gly) Molekül GSH doppeltmarkiert gewesen, und nur jedes 10000. Molekül hätte drei radioaktive Isotope enthalten. Nur eine Doppelmarkierung von GSH mit ^3H -Glu und ^{14}C -Gly erschien sinnvoll, da ^3H verglichen mit ^{14}C mit geringerer Zählkreisbeute erfaßt wird und die Energiespektren deutlich unterschieden sind. Deshalb konnte diese Doppelmarkierung mit gleichen Molmengen trägerfrei eingesetzter Aminosäuren und einem Markierungsverhältnis von 10:1 (^3H -Glu: ^{14}C -Gly) in GSH eingeführt werden. Es wurden 100% Umsatz zu GSH und 92% Einbau von ^{14}C -Gly bzw. 87% Einbau von ^3H -Glu gemessen. Dies entspricht im Rahmen der Versuchsgenauigkeit einem vollständigen Umsatz, die geringen Differenzen lassen sich durch nicht-trägerfreie Substrate oder nicht exakt eingestellte Molmengen erklären.

III.6.7: Reinheit der enzymatisch synthetisierten Peptide

Mit HPLC der freien Peptide konnte eine Reinigung der Peptide von Puffersalzen und unumgesetztem Substrat, aber keine Abtrennung des GSH von Glu-Cys erreicht werden. Analytisch gelingt diese Abtrennung mit dem von Newton et al. (1981) beschriebenen System der Derivatisierung mit Monobrombiman und Auftrennung auf HPLC. Mit dieser Methode ließen sich 1 - 5% Glu-Cys in den enzymatisch hergestellten Präparationen von GSH nachweisen. Die Derivatisierung mit Monobrombiman ist allerdings kovalent und demgemäß nicht ohne nachfolgende chemische Abspaltungsreaktion zur Reinigung von Substraten einzusetzen, die nachher als freie SH-Agentien vorliegen müssen. Im selben HPLC-System wie Newton et al. (1981) hatten Rêeve et al. (1980), Sliwowski und Levine (1985) sowie Kuwata et al. (1986) GSH und andere Cys-haltige Peptide getrennt, nachdem sie diese mit Ellmans-Reagens (DTNB) reagiert hatten. Die Thiole wurden als gemischte Disulfide mit dem Reagens chromatographiert und quantifiziert. Die Quantifizierung gelang auch in eigenen Experimenten mit unmarkierten Substanzen, mit den markierten Substanzen

stellte sich jedoch heraus, daß ein großer Teil der Radioaktivität - auch aus nach dünnstschichtchromatographischer Analyse zu 100 % umgesetzten Ansätzen - bei der Retentionszeit der underivatisierten Aminosäure / Peptide eluierte. War nun die Derivatisierung im Gegensatz zu dem von Reeve et al. (1980), Sliwowski und Levine (1985) sowie Kuwata et al. (1986) geforderten vollständigen Umsatz von Thiolpeptiden mit DTNB zum gemischten Disulfid doch nicht vollständig, oder hatte die Analyse mit DC einen 100%igen Umsatz der Aminosäuren zum GSH nur vorgetäuscht? Die Reaktion zum gemischten Disulfid ist nur die erste Teilreaktion der von Ellman (1959) und Tietze (1969) beschriebenen vollständigen Reaktion von Thiolpeptiden mit oxidiertem Reagens (DTNB) zum reduzierten Reagens und oxidierten Thiolpeptid. Beide Auffassungen widersprechen sich demgemäß.



Die Disproportionierungsreaktion des gemischten Disulfids zum oxidierten Cys-Peptid und reduzierten Reagens ist bei neutralem bis alkalischem pH bevorzugt, aber auch in saurem pH nicht unterbunden (Jocelyn 1972). Deshalb wurde untersucht, in wie weit Cys und DTNB zum gemischten Disulfid bzw. zum reduziertem Reagens und der oxidierten Aminosäure reagieren. Dazu wurden Cys und DTNB als 50% ethanolische Lösungen im Molverhältnis 2 : 1 gemischt, in Laufmittel nach Newton et al. (1981) aufgelöst und in dem von diesen Autoren beschriebenen HPLC-System chromatographiert. Das Ergebnis zeigt Abbildung 45: mit Detektion bei 220 nm erkennt man, daß Cys sowohl oxidiert als auch reduziert vorliegt

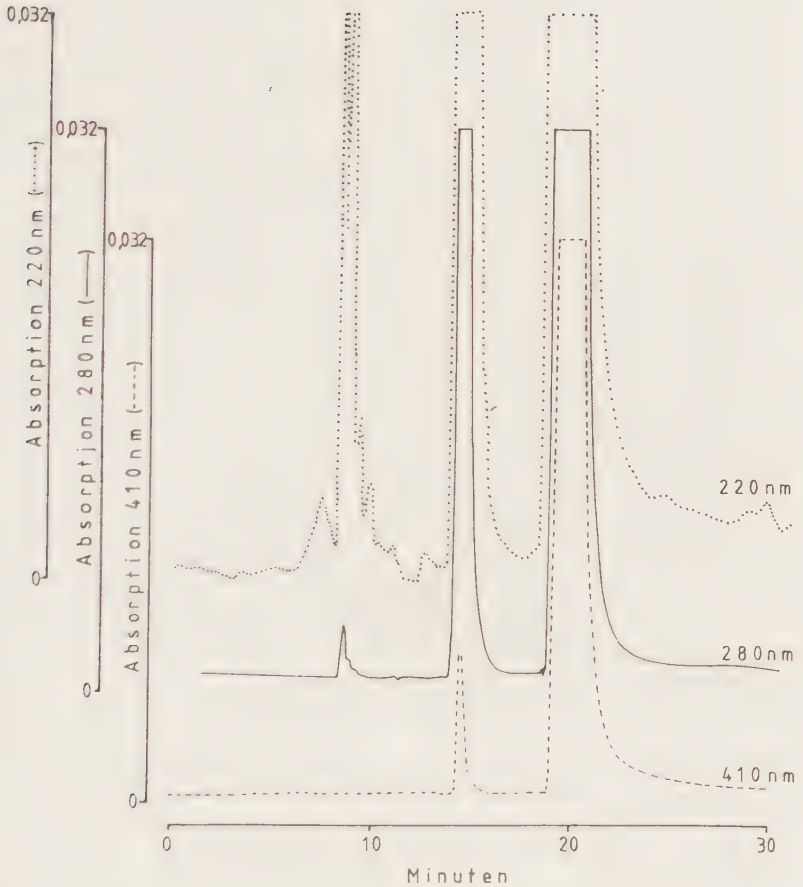


Abbildung 45

Elutionsprofile der HPLC-Analyse mit einem Gradienten von 10-90% Methanol im Laufmittel nach Newton *et al.* (1981) einer Mischung von 1 μ mol Cys mit 0,5 μ mol DTNB. Bei 220 nm absorbieren alle in diesem Gemisch auftretenden Substanzen, mit Detektion bei 280 nm werden aromatische Reste erfaßt, und bei 410 nm zeigt die Dinitrophenyl-Gruppe maximale Absorption.

(Doppelpeak), und daß noch zwei weitere Hauptbanden eluieren. Durch Detektion bei 280 nm (Absorption der Aromaten) sowie 410 nm (Absorption der Nitrobenzolgruppe) konnten diese Substanzen als das gemischte Disulfid bzw. das reduzierte Reagens identifiziert werden. Das reduzierte Reagens wurde außerdem durch Cochromatographie mit chemisch reduziertem Reagens lokalisiert. Das Verhältnis A_{410} / A_{280} betrug für das reduzierte Reagens 1,25, während es im gemischten Disulfid nur 0,04 betrug. Das entspricht den von Riddles et al. (1983) gemachten Beobachtungen. Anhand der Absorption des aromatischen Rings bei 280 nm konnte festgestellt werden, daß sich vom Reagens nur 26,5 % im gemischten Disulfid befanden. Dieser Anteil konnte im beschriebenen Puffersystem nicht verändert werden, auch nicht durch Zugabe eines Überschusses an Cystein. (Ein Überschuß an Thiol gegenüber Ellmans Reagens führt nach Riddles et al. (1983) zur bevorzugten Bildung des gemischten Disulfids). Da sich in der beschriebenen Reaktion jeweils das gleiche Gleichgewicht einstellte, konnten mit dieser Reaktion tatsächlich SH-Gruppen quantifiziert werden, wie es von Reese et al. (1980), Sliwowski und Levine (1985) sowie Kuwata et al. (1986) beschrieben worden war. Zur Reinigung von Thiolpeptiden ist diese Derivatisierung wegen der geringen Ausbeute an gemischtem Disulfid nicht sinnvoll.

III.6.8: Biosynthese des Homogluthathions

Bei der Untersuchung des Vorkommens von PC bzw. hPC in Angehörigen der Fabales war festgestellt worden, daß das Vorliegen von GSH bzw. hGSH über die Synthese des einen oder anderen Satzes von Homologen, bzw. eines Gemisches aus beiden entscheidet. Die Spezifität für Gly oder β -Ala am Carboxyterminus mußte also in der Glutathion-Biosynthese zu suchen sein. Für eine ausschließliche Synthese von hPC bzw. hGSH muß das entsprechende Enzym hochspezifisch für β -Alanin sein, da in den Zellen die für die Proteinbiosynthese nötige Menge Glycin vorhanden sein muß. In Aminosäureanaly-

sen von hGSH-haltigen Suspensionskulturen wurden sowohl β -Ala als auch Gly nachgewiesen. Das Verhältnis β -Ala/Gly betrug bei P. aureus 4,5 und bei G. max 14,2. In Astragalus preussii, einer Pflanze, die sowohl GSH als auch hGSH enthält (siehe Kap. III.2) wurde in einer Suspensionskultur ein Verhältnis β -Ala/Gly von 12,5 gemessen, in R. serpentina, die ausschließlich GSH enthält, wurde dieses Verhältnis zu 9,1 bestimmt. Demnach muß die Glutathionsynthetase in R. serpentina hochspezifisch für Gly sein, um ausschließlich GSH zu synthetisieren. Um diese Hypothese zu überprüfen, mußte Glutathionsynthetase aus pflanzlichem Gewebe isoliert werden.

Über die Glutation-Biosynthese in höheren Pflanzen lagen nur wenige Berichte vor. Die Arbeit von Webster (1953) steht im Widerspruch zu den Ergebnissen aus dem taxonomischen Überblick über Fabales: während in Phaseolus vulgaris ausschließlich Synthese von hGSH und hPC gefunden worden war, stellte Webster (1953) die Synthese eines mit GSH cochromatographierenden Tripeptides aus Glu, Cys und radioaktiv markiertem Gly in Rohextrakten aus Bohnen (Phaseolus vulgaris) fest. Mit radioaktiv markiertem Glu wurde festgestellt, daß der Glutamylrest des GSH durch den Rohextrakt rasch ausgetauscht wurde.

Webster und Varner (1954 a) isolierten Glutamylcysteinsynthetase (GS I) aus Weizenschrot durch Säurepräzipitation (pH = 5,8), Ammoniumsulfatfällung (41 % - 49 % Sättigung) und 1 % Protaminsulfatfällung. Durch die Reinigung wurden angeblich Glutathionsynthetase (GS II), ATPase und ein Glu-Cys-hydrolysierendes Enzym abgetrennt. Das Enzym wies ein pH-Optimum zwischen 7 und 8 auf und benötigte Magnesium- und Kaliumionen. Webster und Varner (1954 b) isolierten GS II aus Weizenschrot wiederum durch Säurefällung (pH = 5,8), Ammonsulfatfällung 53 % - 58% und Protaminsulfatfällung (1 % bei pH = 5,8). ATPase- und Glutamylcysteinsynthetase-Aktivität wurden abgetrennt. Das Enzym benötigte genau wie die GS I K^+ und Mg^{2+} zur Aktivität, das pH-Optimum war

zwischen pH 7 und 8. Die GS II setzte außer Glycin nur Hydroxylamin als Akzeptorsubstrat um.

Zunächst wurde nach diesen Vorschriften versucht, GS I und GS II aus Weizenschrot zu isolieren. In Vorversuchen zeigte sich, daß in den Rohextrakten und auch in den ersten 2 Präparationsschritten keine Glutathionbiosyntheseaktivität festzustellen war. Dies war wenig ermutigend, aber möglicherweise war das Ausgangsmaterial (Weizenschrot der Fa. Sigma) nicht geeignet. Deshalb wurden dieselben Präparationsschritte auch mit Suspensionskulturgewebe von Robinia pseudacacia, das nur hGSH enthielt, versucht. Auch in diesen Versuchen wurde keine Enzymaktivität gefunden, weder Gly noch β -Ala wurden in Peptide eingebaut. Unstimmigkeiten in den Arbeitsvorschriften (auf die in der Diskussion. Kap. IV, näher eingegangen wird) und das völlige Fehlen bestätigender Folgearbeiten während 32 Jahren nach den Veröffentlichungen von Webster und Varner (1954 a, 1954 b) lassen vermuten, daß die beschriebenen Experimente nicht reproduzierbar sind.

III.6.8.1: Reinigung von Glutathionbiosyntheseenzymen aus Pflanzengewebe

Nach dem Scheitern der eben erwähnten Vorversuche blieb nur noch die Hoffnung, analog zur Enzymreinigung aus E. coli vorgereinigte Präparationen aus R. pseudacacia könnten weniger störende Fremdaktivitäten enthalten und Homoglutathion-Syntheseaktivität meßbar sein. Tatsächlich wurde in durch Ammoniumsulfatfällung (30 - 60 % Sättigung) vorgereinigten und gleichzeitig konzentrierten Präparationen festgestellt, daß zwar Gly als Substrat nicht umgesetzt wurde, aber mit freiem β -Alanin eine ATP-verbrauchende Peptidsynthese festzustellen war. Das in Tieren als Speicherform von β -Alanin vorkommende Carnosin (His- β Ala) wurde nicht als Substrat akzeptiert (siehe Tabelle 21 im Abschnitt III.6.8.2). Im Folgenden wurde deshalb die Glutathionsynthetaseaktivität in Robinia pseudacacia mit der für Glutathionsynthetase aus

E. coli ausgearbeiteten Methode in Standardansätzen mit β -Ala an Stelle von Gly bestimmt. Diese nur β -Alanin, aber nicht Glycin umsetzende Enzymaktivität wird im Folgenden als **Homoglutathionsynthetase** bezeichnet.

Im Standard-Testansatz zur Messung der Aktivität von Glutamylcysteinsynthetase wurde mit derselben, durch Ammoniumsulfatfällung (30/60% Sättigung) vorgereinigten Enzympräparation aus R. pseudacacia ebenfalls ein Umsatz festgestellt.

Die Enzymaktivitäten von Glutamylcysteinsynthetase und Homoglutathionsynthetase aus R. pseudacacia ließen sich nicht durch Ammoniumsulfatfällung voneinander trennen, wie dies auch bei den entsprechenden Enzymen aus E. coli der Fall war. Die für die Präparation der GS I und GS II aus E. coli erarbeitete Vorschrift wurde daraufhin im Ganzen für entsprechende Enzympräparationen aus R.pseudacacia übernommen. Aus dem Rohextrakt wurde das zwischen 30 und 60 % Sättigung an Ammoniumsulfat ausfallende Protein gesammelt und zunächst durch Ionentauschchromatographie an QAE-Sepharose FF bei pH = 7 aufgetrennt. Das Elutionsprofil dieser Trennung zeigt Abbildung 46. Wie die entsprechenden Enzyme aus E. coli eluierten die beiden Aktivitäten über viele Fraktionen verteilt und ließen sich nicht völlig voneinander abtrennen. Die Fraktionen mit der jeweils höchsten Aktivität wurden gesammelt, vereinigt und durch Ultrafiltration auf das für die Gelfiltrations-HPLC nötige kleine Volumen eingestellt. Abbildung 47 zeigt das Elutionsprofil der Gelfiltrations-HPLC der Fraktion mit hauptsächlich Aktivität an Homoglutathionsynthetase. Das Elutionsvolumen für die Aktivität von GS I entsprach einem M_r von 80 kDa, die Aktivität von Homoglutathionsynthetase erreichte das Maximum 4 Fraktionen früher, was einem M_r von 115 kDa entspricht.

Da sich in der Fraktion mit Aktivität von Homoglutathionsynthetase immer noch Aktivität von GS I nachweisen ließ, wurde versucht, diese Fraktion weiter zu reinigen. Als große Schwierigkeit erwies sich dabei die Instabilität dieses

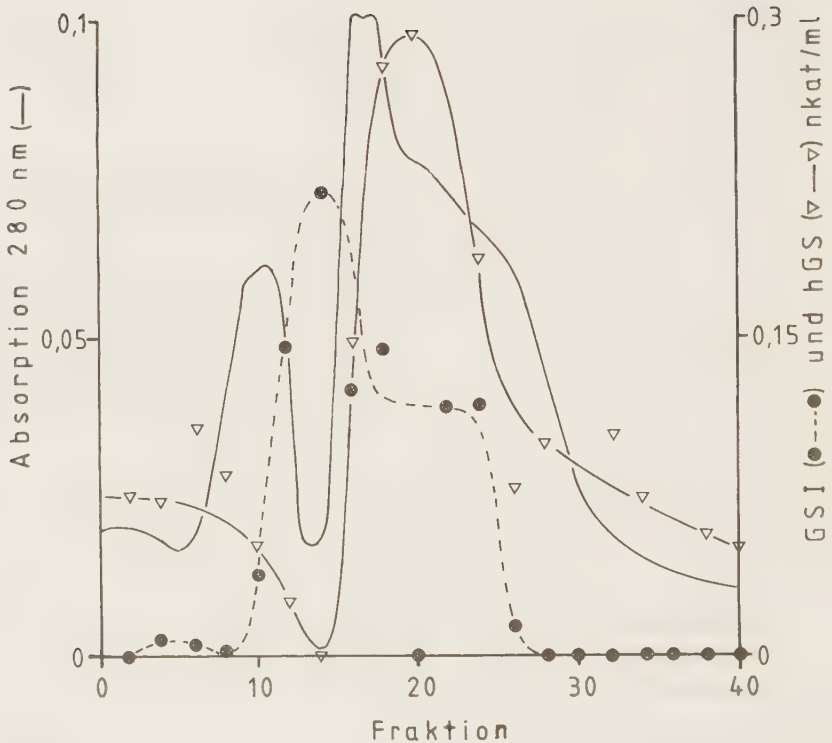


Abbildung 46

Elutionsprofil der Ionentauschchromatographie an QAE-Sepharose einer durch Ammoniumsulfatfällung vorgereinigten Enzympräparation aus *Robinia pseudacacia*. Aufgetragen wurden 20 mg Protein, die Enzymaktivität war erst im Eluat dieser Chromatographie sicher bestimmbar. Die Fraktionen mit der jeweils höchsten Aktivität an γ -Glutamylcysteinsynthetase (GS I) und Homoglutathionsynthetase (hGS) wurden gesammelt und durch Ultrafiltration eingengt.

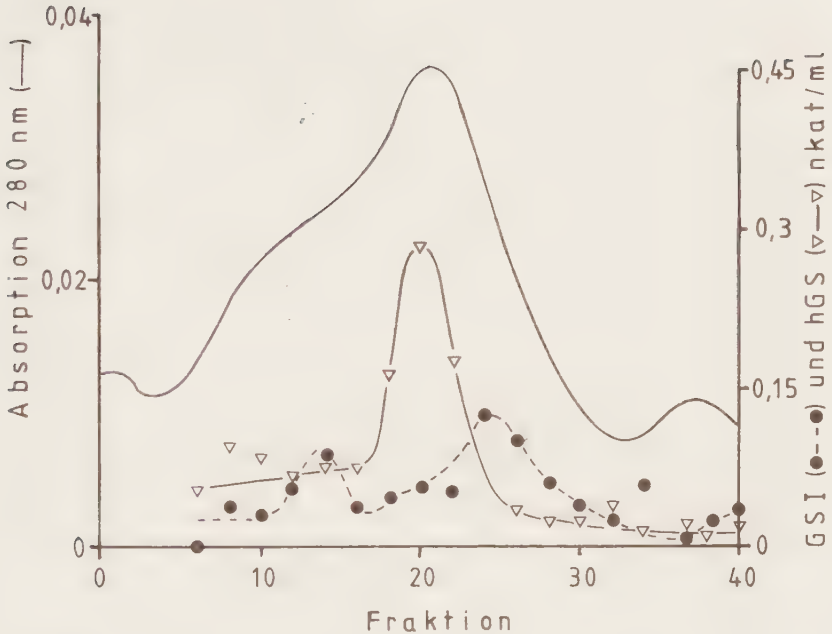


Abbildung 47

Elutionsprofil der Gelfiltrations-HPLC der durch Ionenauschromatographie vorgereinigten Fraktion mit hauptsächlich Homogluthathionsynthetase- (hGS) -Aktivität aus *Robinia pseudacacia* (siehe Abb. 46). Die in der Auftragslösung noch vorhandene Aktivität von -Glutamylcystein-synthetase (GS I) wurde z.T. abgetrennt.

Enzyms in verdünnten Lösungen und im Kontakt mit verschiedenen Säulenmaterialien (Phenylsepharose, Hydroxylapathit). Lediglich mit FPLC an einer Mono-Q-Säule (Pharmacia) ließ sich eine weitere Trennung erreichen. Dieses Säulenmaterial enthält, ebenso wie das in der ersten Ionenauschromatographie verwendete Material, QAE-Gruppen; nun wurde aber ein etwas alkalischerer pH (8,5) eingestellt. Dadurch werden schwach basische Gruppen der Proteine deprotoniert und damit die Bindung an das Säulenmaterial verstärkt. Während bei pH = 7 auf der QAE-Sephärose-Säule die Aktivität von Homogluta-

thionsynthetase bereits bei 80 mM NaCl eluierte, wurde bei pH = 8,5 eine festere Bindung erreicht. Wie Abbildung 48 zeigt, wurde die Aktivität in zwei Fraktionen aufgetrennt, die mit 280 bzw. 420 mM NaCl im Laufmittel (10 mM Tris x HCl) eluierten.

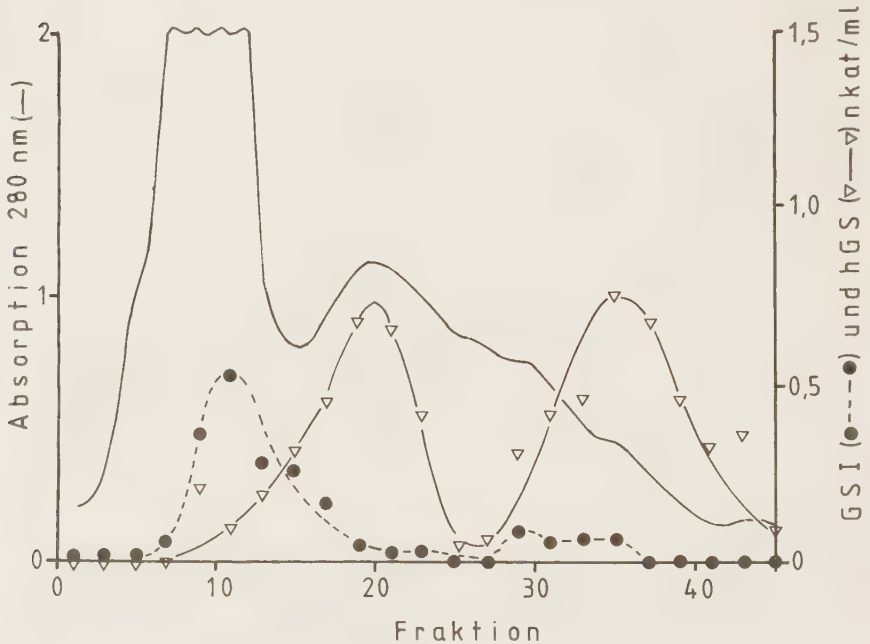


Abbildung 48

Elutionsprofil der Ionenauschromatographie an QAE-Sepharose einer Enzympräparation aus *Robinia pseudacacia*. Im Unterschied zu der in Abbildung 46 dargestellten Reinigung wurde eine FPLC-Mono-Q-Säule (Pharmacia) bei dem höherem pH von 8,5 (vgl. mit pH = 7 für Abb. 46) betrieben. Fraktionen von 1,5 ml wurden gesammelt, die Fraktionen mit der jeweils höchsten Aktivität wurden vereinigt und durch Ultrafiltration eingengt.

Beide Fraktionen wurden gesammelt und durch Ultrafiltration eingengt. Aus 600 g (FG) Zellen von *R. pseudacacia* ließen sich auf diese Weise 47,5 nkat (das entspricht 2,8 U) Akti-

vität von Homogluthathionsynthetase erhalten, die noch mit 10 nkat GS I-Aktivität kontaminiert waren. In der später eluierenden Fraktion fanden sich in derselben Präparation 56,8 nkat Homogluthathionsynthetase-Aktivität, die von der Hauptmenge an Protein und kontaminierender Aktivität von GS I abgetrennt wurde. Die durch Gelfiltration gereinigte GS I aus R. pseudacacia (siehe Abbildung 47) enthielt 31,8 nkat Aktivität. Alle drei Enzympräparationen wurden durch Ammoniumsulfatfällung (60% Sättigung) konzentriert und in dieser Form aufbewahrt. Wegen der im Rohextrakt nicht meßbaren Aktivität, der großen Instabilität der Enzyme während der Reinigung und der vor dem Hintergrund relativ hoher unspezifischer ATPase-Aktivität stark streuenden Daten läßt sich keine Ausbeute und kein Anreicherungsfaktor angeben.

Die Präparation wurde insgesamt 7 mal unter Veränderung aller maßgeblichen Versuchsparameter wiederholt, dabei wurde nur in 4 Präparationen überhaupt Enzymaktivität an Homogluthathionsynthetase und GS I gefunden. Essentiell war das Zufügen von Diethyl-Dithiocarbamat und Polyvinyl-Polypyrrolidon zur Hemmung von Phenoloxidasen resp. Entfernung von deren Substraten. Als Oxidationsschutz wurde 1 mM Cys eingesetzt, höhere Konzentrationen oder andere Reduktionsmittel (Ascorbat, Mercaptoethanol, DTE) zerstörten die Enzymaktivität.

III.6.8.2: Substratspezifität der Homogluthathionsynthetase

Mit den beiden durch FPLC getrennten Fraktionen an Homogluthathionsynthetase-Aktivität wurden wiederum Enzymtests mit Gly und Ala durchgeführt. Tabelle 21 stellt die Daten der Substratspezifitätsmessungen zusammen. Die Enzympräparation war von sehr geringer Aktivität, der Umsatz mit β -Ala lag nur um einen Faktor 10 über der Nachweisgrenze (Phosphatbestimmung). Es zeigte sich auch mit 10-fach höheren Konzentrationen an Gly kein Umsatz durch die Homogluthathionsynthetase-Aktivität. Das Enzym GS II aus E. coli akzept-

Substrat	5 mM Gly	50 mM Gly	5 mM β -Ala	5 mM Carnosin
Enzympräparation	(Aktivitäten in nkat/ml Probe)			
<u>E. coli</u> GS II	1,80	ng	1,22	0,10
<u>R. pseudacacia</u> (NH_4) ₂ SO ₄ -Fällg.	0,01	ng	0,65	0,10
Homoglutathion- Synthetase	0,10 (0,07)	0,10 (0,05)	0,93 (1,15)	ng ng

Tabelle 21

Substratspezifität der Glutathionsynthetase (GS II) aus E. coli und Homoglutathionsynthetase (durch FPLC gereinigt, siehe Abbildung 48) aus R. pseudacacia. Die Phosphatfreisetzung in Standard-Enzymanalysen nach einstündiger Inkubation in Abhängigkeit verschiedener Substrate in den angegebenen Konzentrationen wurde verfolgt. Der 100%-Aktivitätswert ist für jede Enzympräparation unterschiedlich, deshalb wurde die Enzymaktivität in nkat/ml der eingesetzten Probe berechnet. ng: nicht gemessen. In Klammern: die aus der Messung des GSH-hGSH-Gehaltes nach Tietze (1969) berechnete Aktivität in nkat/ml Probe ist angegeben.

tierte interessanterweise auch β -Ala als Substrat, bevorzugt allerdings Gly. Vor einer Aktivitätsbestimmung über das Tripeptid-Reaktionsprodukt mußte geklärt werden, ob hGSH in der GSH-Bestimmung nach Tietze (1969) erfaßt wird und welcher Umsatz mit der Glutathionreduktase erzielt wird. Carnegie (1963) hatte festgestellt, daß hGSH mit der Glutathionreduktase wie GSH reagiert. Eigene Versuche bestätigten, daß hGSH aus Phaseolus aureus im enzymatischen Test nach Tietze mit der gleichen Empfindlichkeit erfaßt wird wie GSH. Deshalb wird davon ausgegangen, daß die GSH-Bestimmungen der Reaktionsprodukte mit dem enzymatischen Test auch für Homoglutathionsynthetase korrekt sind. Tabelle 21 führt diese Daten mit auf.

In Kontrollansätzen mit Gly, auch ohne Zusatz von ATP, wurden geringe Mengen von GSH / hGSH mit dem enzymatischen Test festgestellt, unter 10 % des Wertes nach Reaktion mit ATP und β -Ala (Tabelle 21). Diese Messung ist vermutlich

auf von Enzymprotein mitgeschlepptes GSH bzw. hGSH zurückzuführen, da mit und ohne Zusatz von ATP der gleiche Kontrollwert gemessen wurde. Wurde das Enzymprotein vor der Aktivitätsbestimmung reduziert und über Sephadex G-25 entsalzt, um wie für GS II aus E. coli beschrieben kontaminierende Metaboliten zu entfernen (in diesem Zusammenhang vor allem hGSH), so ließ sich anschließend keine Enzymaktivität mehr feststellen. Durch die enzymatische Bestimmung des Reaktionsproduktes hGSH konnte aber nachgewiesen werden, daß das Enzym bevorzugt β -Ala umsetzt und das Reaktionsprodukt dementsprechend tatsächlich hGSH ist.

Dieses aus R. pseudacacia erhaltene Enzym kann deshalb als **Homoglutathionsynthetase** bezeichnet werden.

Die von Webster und Varner (1954 a) für die GS II aus Weizen beschriebene Abhängigkeit von K^+ -Ionen konnte für die Homoglutathionsynthetase aus R. pseudacacia nicht festgestellt werden. Der zeitliche Verlauf der Enzymreaktion wurde verfolgt (Abbildung 49). Der lineare Verlauf der Anhäufung des Reaktionsproduktes Phosphat belegt, daß die eingesetzten 5 mM Aminosäuren bzw. 15 mM ATP Substratsättigung bedeuteten.

Für die Homoglutathionsynthetase wurde ein pH-Optimum von 8,5 ermittelt (siehe Abbildung 50), deutlich alkalischer als das von GS II aus Weizen (Webster und Varner, 1954 b) von pH 7,5. Verschiedene Pufferionen, darunter HEPES und Phosphat, führten bei pH 8,4 zu deutlich geringeren Umsätzen, die in diesem Fall zusätzlich durch HPLC-Analyse der gebildeten Peptide verfolgt wurden. Auch die für den pH-Bereich über 9 eingesetzte Glycinkonzentration von 100 mM zeigte einen hemmenden Effekt. Die hohe Spezifität des Enzyms für β -Ala wird bestätigt dadurch, daß auch unter diesen Bedingungen mittels HPLC-Analyse kein GSH als Reaktionsprodukt gefunden wurde.

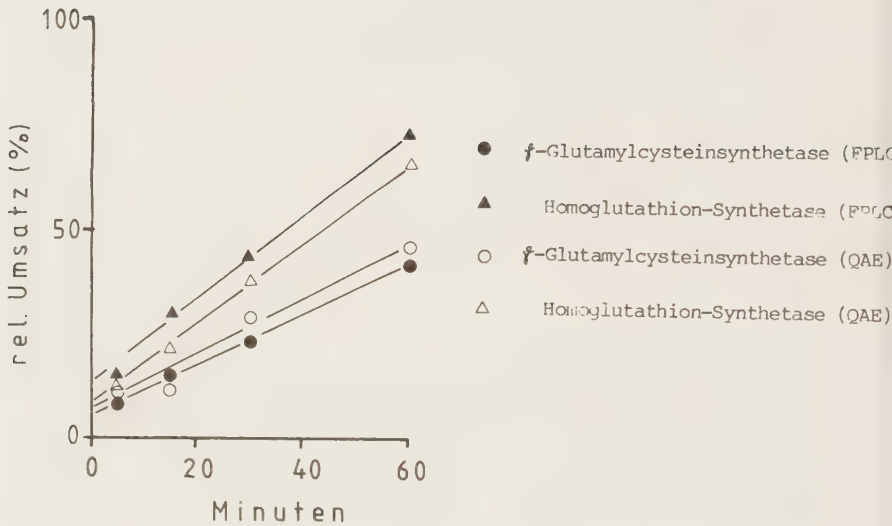


Abbildung 49

Zeitlicher Verlauf der Anhäufung des Reaktionsproduktes Phosphat bei der enzymatischen Synthese von hGSH mit Enzymen aus Robinia pseudacacia. 100% Umsatz entsprachen 800 nmol freigesetzten Phosphats in der Standard-Enzymaktivitätsbestimmung in einem Ansatz von 160 μ l. Der lineare Verlauf belegt die vorliegende Substratsättigung.

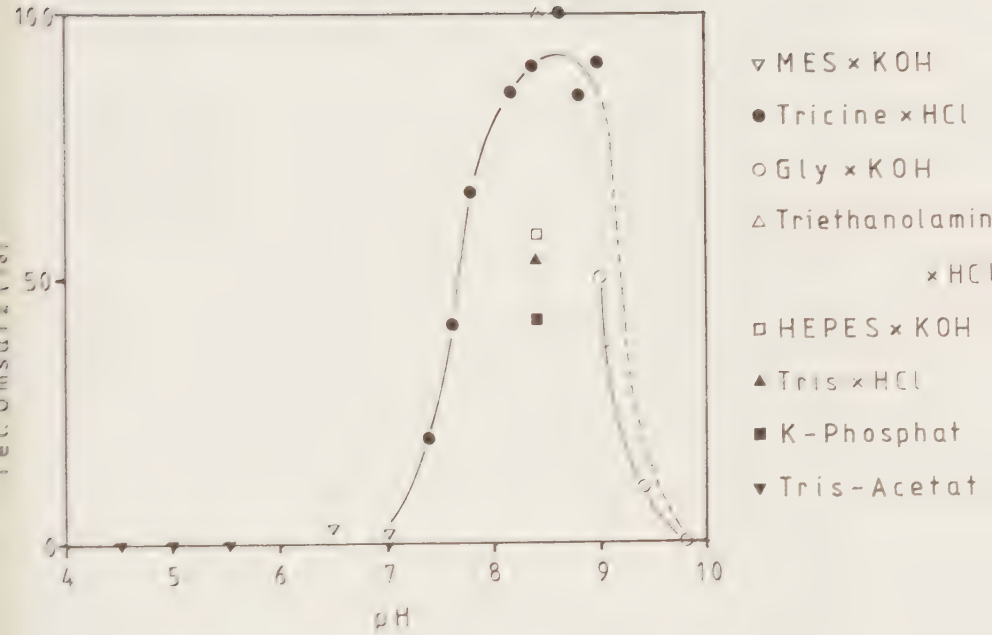


Abbildung 50

Enzymaktivitätsabhängigkeit einer Enzympräparation aus *Proteinase* in Abhängigkeit vom PufferpH und vom pH. Die durch Zimmertrennungsfällung und Ionenaustauschchromatographie (siehe Abb. 46) erhaltene Enzympräparation wurde in Ansätzen mit gleicher Katalysatorkonzentration (10% w/v) verschiedener Pufferlösungen bei verschiedenen pH-Werten während der Freisetzung von Phosphat gemessen. 100% Umsatz entspricht der 800 nmol freigesetzten Phosphats im Enzymansatz von 160 µl. Verschiedene Pufferlösungen wurden bei pH = 8,4 verglichen. Der gestrichelte Kurvenverlauf oberhalb von pH = 9 ergibt sich aus der Korrektur für den hemmenden Einfluß von 100 mM Gly.

III.7: Fütterung von Peptidsubstraten an Suspensionskulturen

Wenn GSH oder Glu-Cys direkte Substrate für die PC-Synthese sind, muß eine Hemmung der Glu-Cys-Synthese eine Hemmung der PC-Synthese nach sich ziehen. Diese Hemmung sollte sich durch Zugabe von GSH wieder aufheben lassen. Wenn die PC-Synthese durch die Substratkonzentration begrenzt ist, muß sich eine Veränderung der Konzentration von GSH oder Glu-Cys in einer entsprechenden Erhöhung oder Verminderung des Gehalts an PC und der Schwermetalltoleranz auswirken. Diese Arbeitshypothesen wurden mit Zellkultur-Reihenversuchen mit Fütterung verschiedener Substrate untersucht.

Die intrazelluläre GSH-Konzentration kann durch spezifische Hemmung der GS I mit L-Buthionin-S-Sulfoximin (BSO) gesenkt werden (Griffith und Meister, 1979). Die Hemmung wird aus dem Reaktionsmechanismus der GS I verständlich: Glu wird zunächst phosphoryliert und über das Phosphat kovalent an das Enzym gebunden. Die so aktivierte Glutaminsäure wird durch die Reaktion mit Cys (oder mit ABA zum γ -Glutamylaminobutyrat, Glu-ABA) zum Dipeptid umgesetzt und das Dipeptid dadurch aus der kovalenten Bindung freigesetzt. BSO ist sterisch analog zu Glu-ABA (Abbildung 51), und wird kompetitiv zu Glu (relativer K_i -Wert bei 5 mM Glu: $K_i = 1 \mu\text{M}$ BSO) über die Sulfoxygruppe kovalent an das Enzym gebunden (Griffith, 1981).

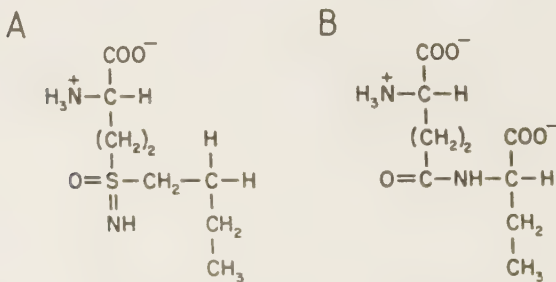


Abbildung 51

Strukturformeln des für γ -Glutamylcysteinsynthetase hochspezifisch wirksamen Hemmstoffs Buthionin-Sulfoximin (A) und des in-vitro-Reaktionsprodukts γ -Glutamyl-L-Aminobuttersäure (B).

Ist BSO ans Enzym gebunden, kann Cys wegen der sterischen Hinderung durch den räumlich großen Butylrest nicht angreifen und das BSO nicht aus der Bindung ans Enzym freisetzen. Dadurch wird das Enzym inaktiviert (Griffith, 1981, Meister, 1985).

Wirkt dieser Hemmstoff auch auf pflanzliche GS I? Das verglichen mit BSO weniger spezifische Methionin-Sulfoximin (von Meister und Tate (1976) als effektiver Hemmstoff für die GSH-Synthese beschrieben) wurde von Rennenberg und Uthemann (1980) auf photoheterotroph wachsende Tabak-Suspensionskulturzellen angewandt. 10^{-8} M Methionin-Sulfoximin reichten aus, um 50 % Wachstumshemmung zu erreichen. Dem Medium zugegebenes GSH und Glutamin konnten diese Hemmung aufheben. Dies zeigte, daß der Hemmstoff, der in Tieren die GSH-Biosynthese hemmte, auch in Pflanzenzellen wirksam war, und - im Gegensatz zu Säugetierzellen - die Pflanzenzellen das Glutathion ohne Weiteres aus dem Medium aufnehmen konnten.

Grill et al. (1987) und Grill (1987) wandten BSO auf Suspensionskulturen von R. serpentina an und untersuchten das Wachstum und den PC-Gehalt nach Belastung mit verschiedenen Konzentrationen an Silberionen. Die mit BSO behandelten Kulturen zeigten verglichen mit Kulturen ohne Hemmstoff nach der Belastung mit Ag^+ eine stärkere Wachstumshemmung. Das relative Wachstum wurde durch den Hemmstoff allein in den verwendeten Konzentrationen nicht beeinflußt, im Gegensatz zu der photoheterotroph wachsenden Tabaksuspensionskultur, die GSH als Oxidationsschutz in den Chloroplasten benötigt (Rennenberg 1982).

III.7.1 Beeinflussung der intrazellulären GSH-Konzentration

Um nun zunächst zu untersuchen, wie BSO die intrazelluläre GSH-Konzentration beeinflußt, und ob eine Verminderung der intrazellulären GSH-Konzentration durch dem Medium zugegebenes GSH wieder aufzuheben ist, wurden zwei Zellkulturen von

R. serpentina mit 0,5 mM BSO versetzt und in kurzen Zeitabständen Proben entnommen und die GSH-Konzentration bestimmt. Nach acht Stunden war die intrazelluläre GSH-Konzentration auf 40 % des Ausgangswertes abgesunken (Abbildung 52). Einer der Kulturen wurde nun 1 mM GSH (+ 100 μ M DTE) zugesetzt und der GSH-Gehalt im Vergleich zur unverändert belasteten Kontrollkultur verfolgt.

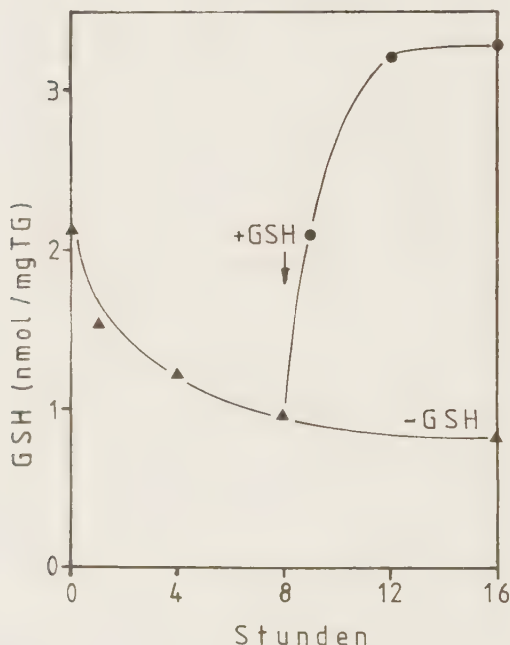


Abbildung 52

Beeinflussung der intrazellulären GSH-Konzentration von Suspensionskulturen von R. serpentina durch 0,5 mM BSO (Beim Start der Aufzeichnungen gegeben) und anschließende Gabe von 1 mM GSH und 100 μ M DTE (Pfeil). Eine nicht mit BSO gehemmte Kontrollkultur wies während der Versuchsdauer einen GSH-Gehalt von 2,3 $\pm$ 0,18 nmol/mg TG auf. Kontroll- und gehemmte Kulturen wuchsen während der Versuchsdauer von 4,3 gTG/l auf 5,1 gTG/l heran.

Während die Kontrollkultur weiterhin einen GSH-Gehalt von 40 % des Ausgangswertes (2,25 nmol/mg TG) hatte, stieg der intrazelluläre GSH-Spiegel in der mit GSH gefütterten Kultur auf das 1 1/2 - fache des Ausgangswertes an. Bei Zugabe von 700 - 4000 μ M GSH zu Suspensionskulturen von R. serpentina, die nicht mit BSO gehemmt worden waren, wurde gleichmäßig eine Erhöhung der intrazellulären GSH-Konzentration von 2,3 $\pm$ 0,3 nmol/mg TG auf Werte von 3,5 $\pm$ 0,3 nmol/mg TG erzielt. Die wegen der Hemmung der GS I mit BSO verminderte GSH-Konzentration erhöhte sich nach 24 Stunden wieder und erreichte nach 36 Stunden den Ausgangswert. Dieser Befund läßt sich z. B. durch Enzymneusynthese erklären.

III.7.2 PC-Synthese trotz Hemmung der GSH-Synthese

Wenn die Hypothese zutrifft, daß PC aus Glu-Cys und/oder GSH und nicht aus den freien Aminosäuren synthetisiert wird, so sollte sich die Hemmung der PC-Synthese nach BSO-Gabe (Grill et al. 1987) durch Zugabe von GSH aufheben lassen. Gleichzeitig war eine interessante Frage in diesem Zusammenhang, ob entsprechend belastete Kulturen von Glycine max oder Phaseolus aureus ähnliche Hemmung ihres hGSH-Gehaltes durch BSO zeigten, und ob diese Verminderung durch Gabe von GSH oder hGSH aufgehoben werden konnte. Bemerkenswert ist hierzu die Nachricht von Bergmann und Rennenberg (1975), daß das Wachstum von Calluskulturen von G. max durch 100 μ M GSH zu 50 % gehemmt wurde. Zu Beantwortung dieser Fragen wurden Suspensionskulturen von R. serpentina und G. max mit 0,5 mM BSO gehemmt, nach 8 Stunden mit GSH bzw. hGSH (1 mM, + 100 μ M DTE) versetzt und nach weiteren 6 Stunden mit Cd^{2+} belastet. Zu diesem Zeitpunkt erhielten alle mit BSO gehemmten Kulturen eine weitere Zugabe von 0,5 mM des Hemmstoffs, um zwischenzeitlich neusynthetisierte GS I zu hemmen. Das relative Wachstum sowie der GSH/hGSH- und PC/hPC- Gehalt der Zellen wurde verfolgt und mit ungehemmt bzw. unbelastet gebliebenen Kulturen verglichen. Das Schema der Durchführung dieser Versuche und die Ergebnisse zeigen die Tabellen 22- 25.

In den folgenden Tabellen stellt jedes Rechteck Analysen von je 2 Suspensionskulturen dar, in denen die eingetragenen Werte (Doppelbestimmungen) gemessen wurden:

GSH (nmol SH/mg TG); PC (nmol Glu-Cys-Einheiten/mgTG)
(Wachstum) (g TG/l)

Tabelle 22 <u>R. serpentina</u> , Fütterung mit GSH (homologes System)				
Start	16 h	20 h	59 h	
1,08 (2,61)	+BSO	0,51 (2,94)	+GSH	1,27 (3,09)
			-GSH	0,46 (2,92)
			+Cd ²⁺	0,81 PC:3,14 (4,08)
			+Cd ²⁺	0,33 PC:0,31 (3,35)
	-BSO	1,72 (3,13)	+Cd ²⁺	0,89 PC:3,63 (4,11)
			-Cd ²⁺	1,46 PC:0,24 (4,54)

Tabelle 23 <u>R. serpentina</u> , Fütterung mit hGSH (heterologes System)				
Start	16 h	20 h	59 h	
2,77 (4,03)	+BSO	1,70 (5,14)	+hGSH	1,53 (6,05)
			-hGSH	1,07 (4,62)
			+Cd ²⁺	0,51 PC:1,14 (5,98)
			+Cd ²⁺	0,50 PC:0,0 (4,81)
	-BSO	2,90 (4,68)	+Cd ²⁺	3,12 PC:7,17 (6,21)
			-Cd ²⁺	3,26 PC:0,0 (7,67)

Tabellen 22 und 23

PC-Synthese nach Hemmung der GS I mit BSO und Fütterung von GSH (Tab. 22) bzw. hGSH (Tab. 23) an Suspensionskulturen von R. serpentina. Den Kulturen (30 ml) waren zu den angegebenen Zeiten 0,5 mM BSO bzw. 1 mM GSH + 0,1 mM DTE bzw. 200 µM Cd²⁺ zugefügt worden. Kulturen, die zu Beginn des Versuchs mit BSO gehemmt worden waren, erhielten bei Cd²⁺-Zugabe erneut 0,5 mM BSO. Jedes Rechteck stellt eine Kultur dar, die zum angegebenen Zeitpunkt geerntet wurde. Die Meßwerte für GSH, nach Belastung mit Cd²⁺ auch für PC wurden in HPLC-Analysen mit SH-spezifischer Detektion ermittelt.

In den folgenden Tabellen stellt jedes Rechteck Analysen von je 2 Suspensionskulturen dar, in denen die eingetragenen Werte (Doppelbestimmungen) gemessen wurden:

hGSH (nmol SH/mg TG); hPC (nmol Glu-Cys-Einheiten/mgTG)
(Wachstum) (g TG/l)

Tabelle 24 <u>G. max</u> , Fütterung mit hGSH (homologes System)				
Start	16 h	20 h	59 h	
	+BSO	+hGSH 1,97 (1,0)	+Cd ²⁺ 2,86 (1,3)	0,19 hPC:0,14 (2,4)
		-hGSH 0,73 (1,2)	+Cd ²⁺	0,15 hPC:0,0 (1,0)
2,16 (3,30)			+Cd ²⁺	2,88 hPC:1,28 (5,3)
	-BSO	2,61 (4,3)	-Cd ²⁺	5,22 hPC:0,0 (9,8)

Tabelle 25 <u>G. max</u> , Fütterung mit GSH (heterologes System)				
Start	16 h	20 h	59 h	
	+BSO	+GSH 0,25 (5,78)	+Cd ²⁺ 0,15 (2,98)	0,0 hPC:0,06 (4,65)
		-GSH 0,23 (5,61)	+Cd ²⁺	0,16 hPC:0,18 (3,79)
1,01 (3,76)			+Cd ²⁺	0,50 hPC:1,39 (6,47)
	-BSO	0,71 (5,31)	-Cd ²⁺	0,31 hPC:0,04 (8,16)

Tabellen 24 und 25

PC-Synthese nach Hemmung der GS I mit BSO und Fütterung von hGSH (Tab. 24) bzw. GSH (Tab. 25) an Suspensionskulturen von G. max. Den Kulturen (30 ml) waren zu den angegebenen Zeiten 0,5 mM BSO bzw. 1 mM GSH + 0,1 mM DTE bzw. 200 µM Cd²⁺ zugefügt worden. Kulturen, die zu Beginn des Versuchs mit BSO gehemmt worden waren, erhielten bei Cd²⁺-Zugabe erneut 0,5 mM BSO. Jedes Rechteck stellt eine Kultur dar, die zum angegebenen Zeitpunkt geerntet wurde. Die Meßwerte für hGSH, nach Belastung mit Cd²⁺ auch für hPC wurden in HPLC-Analysen mit SH-spezifischer Detektion ermittelt.

In den mit BSO gehemmten Kulturen wurde der GSH/hGSH-Gehalt auf 50-30 % des Ausgangswertes gesenkt, während das Wachstum unbeeinflusst blieb. Wurden mit BSO gehemmte Kulturen zusätzlich noch mit Cd^{2+} (100 μM) belastet, so wurde im Gegensatz zu nicht mit BSO gehemmten Kontrollen kein PC synthetisiert und das Wachstum auf die Hälfte vermindert. Dies bestätigt die Ergebnisse von Grill et al. (1987). Über dessen Versuche hinausgehend wurde mit der Zugabe von GSH zu BSO-gehemmten Kulturen von R. serpentina bzw. Zugabe von hGSH zu BSO-gehemmten Kulturen von G. max (also jeweils im homologen System) die intrazelluläre GSH- bzw. hGSH-Konzentration wieder deutlich angehoben und nach Belastung mit Cd^{2+} die PC-Synthese ermöglicht. In dem dargestellten Experiment mit R. serpentina wurde dabei fast der PC-Induktionswert der nicht mit BSO gehemmten Kontrolle erreicht. Bei Suspensionskulturen von G. max, deren GS I gehemmt worden war, erlaubte die Fütterung mit hGSH nur 11% der hPC-Synthese der Kontrolle. In nicht mit hGSH gefütterten Kulturen von G. max wurde nach Hemmung mit BSO kein hPC synthetisiert.

Die (heterologe) Fütterung von hGSH beeinflusste das Wachstum der Kulturen von R. serpentina nicht negativ, verglichen mit der Kontrolle. Im Gegensatz dazu wurde bei G. max durch die Fütterung mit GSH (also ebenfalls im heterologen System) eine vollständige Hemmung des Wachstums verglichen mit der Kontrolle festgestellt. In BSO-gehemmten Zellen von G. max wurde nach Zugabe von GSH keine Synthese von PC oder hPC festgestellt. Im Verlauf der Versuchsdauer zeigte eine mit BSO gehemmte, mit hGSH (also homolog) gefütterte, aber nicht mit Cd^{2+} belastete Kultur von G. max einen Abbau des zunächst aufgenommenen hGSH zu einer Substanz, die mit der Retentionszeit von GSH eluierte, möglicherweise Glutamylcystein. Der Nachweis der Zusammensetzung dieser Substanz durch Aminosäureanalyse konnte nicht geführt werden, da nicht genügend Material isoliert werden konnte. Wurde in einem Experiment nach gleichem Schema der Kultur von R. serpentina statt GSH hGSH (also im heterologen System) gefüttert, so

konnte auch mit dieser Zugabe 16% der PC-Synthese (nicht hPC-Synthese) der Kontrolle festgestellt werden. Auch wurde GSH, nicht hGSH in den mit hGSH gefütterten Zellen von R. serpentina gefunden. Dies ist vereinbar mit der Hypothese, daß zum Zeitpunkt der Analyse das carboxyterminale β -Ala bereits abgespalten und durch Gly ersetzt worden war. Auf einen möglichen Austausch der carboxyterminalen Aminosäure des GSH wird in der Diskussion (Kap. IV) näher eingegangen.

III.7.3 Einbau radioaktiv markierter Peptide in PC

Die PC-Synthese trotz Hemmung der GS I, die nach Fütterung von GSH festgestellt wurde, belegt den Einbau unabhängig von der PC-Synthese hergestellter Glu-C γ S-Einheiten in PC. Um noch mit einer weiteren, unabhängigen Methode nachzuweisen, daß tatsächlich das zugegebene GSH (oder Glu-Cys) nach Cd²⁺-Belastung in PC eingebaut wird, wurden Zellkulturen von R. serpentina radioaktiv markiertes GSH und Glu-Cys (siehe Kap. III.6.6) angeboten. An mehreren Positionen, in verschiedenen Aminosäuren unterschiedlich und spezifisch markiertes GSH sollte in diesen Versuchen über das Verhältnis der Markierungen zueinander Aufschluß darüber geben, ob das intakte Molekül eingebaut wird (das Markierungsverhältnis bleibt konstant) oder ob nur einzelne Aminosäuren daraus eingebaut werden (das Markierungsverhältnis kann sich ändern). In Vorversuchen war die Aufnahme der radioaktiv markierten Substrate in das Zellinnere unerwartet gering. Zunächst waren geringe Molmengen der Peptide (1 - 5 μ M im Medium) mit besonders hoher spezifischer Markierung eingesetzt worden. Trotz der Zugabe von 50 μ M DTE wurden die Peptide nicht in die Zellen aufgenommen. Erst bei höheren Konzentrationen (zwischen 100 μ M und 1 mM) an GSH im Medium wurde eine Aufnahme der radioaktiv markierten Peptide in die Zellen festgestellt, die zwischen 1 und 5 % der eingesetzten Radioaktivität betrug. 1% der dem Medium (30 ml) zugesetzten Molmenge GSH (Konzentration 1 mM, das sind in 30 ml 30 μ mol) reichen aus, die in Abb. 52 dargestellte Erhöhung des Intra-

zellulären GSH-Gehaltes von 2,2 auf 3,3 nmol GSH/mg TG (bei 10 g TG/l) zu erklären. Es wurde demnach mit unmarkiertem und mit markiertem GSH in etwa dieselbe relative Aufnahme erzielt. Nach Belastung der Suspensionskulturen mit Cd^{2+} wurde die aufgenommene Radioaktivität teilweise in PC-Peptide eingebaut. Tabelle 26 stellt die Daten eines Einbauversuches zusammen. Je 5 μCi mit ^{35}S -Cys markierten Glutathions waren dem Medium von zwei Suspensionskulturen von R. serpentina zugegeben worden. Eine dieser Kulturen war vorher zur Hemmung der GS I mit BSO behandelt worden. In dieser Kultur wurden 36% der aufgenommenen Radioaktivität in PC-Peptide eingebaut. Die Peptidmengen - sowohl GSH als auch PC - waren wegen der Hemmung der GS I deutlich geringer als in der Kontrolle. In der Kontrollkultur ohne Hemmung der GS I mit BSO wurden nur 26% der aufgenommenen Radioaktivität in PC eingebaut.

Das Ergebnis eines weiteren ähnlichen Experimentes ist in Abbildung 53 als Elutionsprofil einer HPLC-Analyse dargestellt. 30 ml Suspensionskultur von R. serpentina, deren GS I mit BSO gehemmt worden war, waren 3 μCi ^{14}C -Gly-markiertes GSH gefüttert worden, nach 4 Stunden Aufnahme des Peptids in die Zellen wurde die Kultur mit 200 μM Cd^{2+} belastet und für weitere 2 Tage inkubiert. Aus einem Teil dieser Zellen wurde ein Rohextrakt nach der Schnellaufschlußmethode hergestellt und eine Menge dieses Extraktes, die 400 mg (von 12 g FG) entsprach, wurde injiziert. Das HPLC-Eluat wurde mit SH-spezifischer Detektion analysiert und in Fraktionen von 1,25 ml aufgefangen. Die gesamten Fraktionen wurden mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität gemessen. Aus der Summe der Zählraten in diesen Fraktionen wurde errechnet, daß 37 nCi Radioaktivität aufgenommen wurden, das entspricht 1,3 % der zugegebenen Menge.

Um ein Maß für den Markierungsgrad der einzelnen Peptide zu erhalten, wurde die Summe der Zählraten in entsprechenden Fraktionen auf die Integrationsfläche der SH-Detektion des HPLC-Eluats bezogen. Bei Markierung mit Gly hätte dieses

Tabelle 26 Einbau radioaktiv markierten Glutathions in PC

Ohne Hemmung der GS I:				
	GSH	PC2	PC3	PC4
Aufnahme (% der appl. Akt.)	(insgesamt 225 nCi oder 4,5%)			
	3,58	0,45	0,18	0,25
Zählrate (cpm)	87764	11093	4336	6237
Peptidmenge (nmol SH)	10,17	19,34	42,23	15,90
$\frac{\text{cpm}}{\text{nmol SH}}$	8630	574	103	392

Nach Hemmung der GS I mit BSO:				
	GSH	PC2	PC3	PC4
Aufnahme (% der appl. Akt.)	(insgesamt 290 nCi oder 5,8%)			
	4,23	0,55	0,51	0,46
Zählrate (cpm)	103773	13545	12501	11319
Peptidmenge (nmol SH)	4,33	4,21	9,59	3,23
$\frac{\text{cpm}}{\text{nmol SH}}$	23966	3217	1303	3504

Tabelle 26

Einbau von (^{35}S -Cys)-GSH in PC durch Suspensionskulturen von *R. serpentina*. Eine Kultur wurde 8 h vor der GSH-Zugabe mit 0,5 mM BSO zur Hemmung der GS I versetzt, die Kontrollkultur erhielt keinen Hemmstoff. Je 5 μCi markiertes GSH (447 Ci/mol) wurden zugegeben und mit unmarkiertem GSH und DTE versetzt (Endkonzentrationen 1 mM bzw. 0,1 mM in 1,5 ml-Kulturen). 4 h nach dieser Zugabe wurden beide Kulturen mit 200 μM Cd^{2+} belastet. Nach 2 Tagen Belastungsdauer wurden die PC-Peptide über HPLC mit SH-spezifischer Detektion getrennt und das Eluat entsprechend der Integrationsgrenzen fraktioniert aufgefangen. Der Quotient aus den in diesen Fraktionen gemessenen Zählraten und den als nmol SH bestimmten Mengen an Glu-Cys-Einheiten gibt ein Maß für den Markierungsgrad der Peptide.

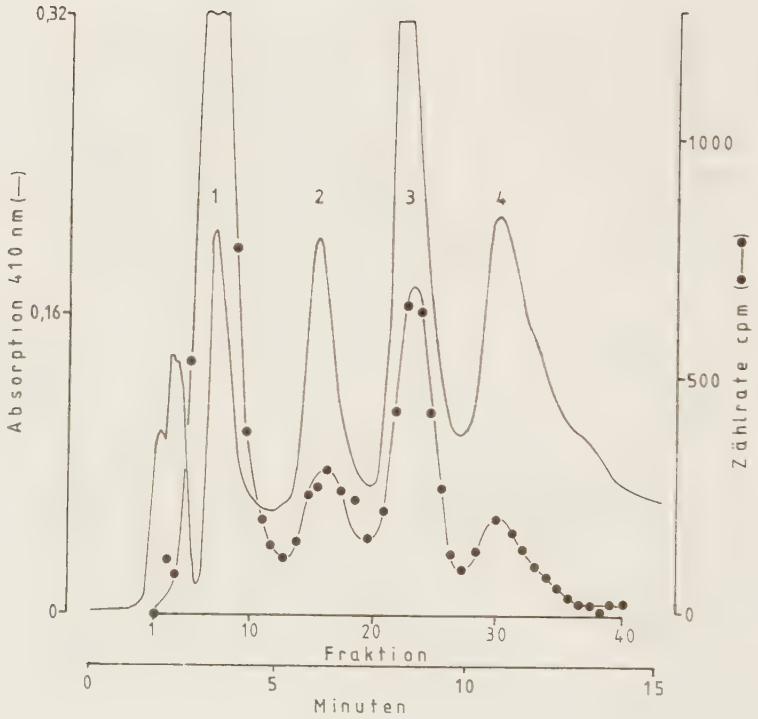


Abbildung 53

Elutionsprofil der HPLC-Analyse des Einbaus von radioaktiv markiertem Glutathion in PC. Injiziert worden waren 250 μ l eines Schnellaufschlusses aus einer Suspensionskultur von *R. serpentina*, der nach 6 h Hemmung mit 0,5 mM BSO 1 mM ^{14} C-Gly-markiertes GSH (0,17 Ci/mol) und 100 μ M DTE zugesetzt worden waren. Nach weiteren 2 h war die Kultur mit 200 μ M Cd^{2+} belastet und 2 Tage weiterkultiviert worden. Das Eluat wurde in Fraktionen entsprechend 0,3 min. aufgefangen und die Fraktionen im Scintillationszähler gezählt. Die Indexzahlen n geben die Anzahl Glu-Cys-Einheiten in den einzelnen Peptiden an.

Verhältnis von 1 im GSH über 0,5 im PC 2 zu 0,33 im PC 3 u.s.w. abnehmen sollen. Bei Markierung mit Glu oder Cys wäre ein in den einzelnen Peptiden identischer Markierungsgrad zu erwarten gewesen. Die Daten aus den HPLC-Elutionsprofilen entsprachen aber nicht diesen Erwartungen: die auf SH-Absorption bezogene Markierung nahm wesentlich stärker ab, nicht nur bei ^{14}C -Gly, sondern bei allen untersuchten Markierungen. Tabelle 27 stellt die aus Fütterungen mit 5 verschiedenen singularär markierten GSH- bzw. Glu-Cys-Peptiden erhaltenen Daten zusammen.

Substrat	Aufn. %	GSH	PC2	PC3	PC4
^3H -Glu GSH	0,86 %Einbau cpm/nmol SH	54,8 846	11,4 151	21,8 60	11,8 81
^{35}S -Cys GSH	0,5 %Einbau cpm/nmol SH	48,9 513	8,7 39	22,9 53	9,1 38
^{14}C -Gly GSH	0,78 %Einbau cpm/nmol SH	47,9 1220	5,8 349	30,3 288	12,4 113
^3H -Glu GC	1,2 %Einbau cpm/nmol SH	44,0 1520	9,2 349	32,2 288	11,3 113
^{35}S -Cys GC	1,3 %Einbau cpm/nmol SH	33,0 200	18,0 108	28,5 36	12,7 22

Tabelle 27

Einbau von radioaktiv markiertem GSH und GC in PC durch Suspensionskulturen von *R. serpentina*, deren GS I durch 0,5 mM BSO gehemmt worden war. Je 1 μCi der markierten Substrate (eingestellt auf 0,33 Ci/mol) wurden mit DTE versetzt und den Kulturen zugegeben (Endkonzentrationen in 30 ml Kultur: 100 μM bzw. 50 μM). 4 h nach dieser Zugabe wurden die Kulturen mit 200 μM Cd^{2+} belastet. Nach 2 Tagen Belastungsdauer wurden die PC-Peptide über HPLC mit SH-spezifischer Detektion getrennt und das Eluat fraktioniert aufgefangen. Der Quotient cpm/nmol SH (Glu-Cys-Einheiten in PC) gibt ein Maß für den Markierungsgrad der Peptide.

Bemerkenswert ist, daß bei Fütterung von Glu-Cys eine gegenüber dem mit der gleichen Markierung versehenen GSH eine 1,5- (^3H -Glu) bis 2,5-fach (^{35}S -Cys) erhöhte Aufnahme in die Zellen und ein verstärkter Einbau der aufgenommenen Radioaktivität in PC beobachtet wurde.

Zum Nachweis des Einbaus intakter Moleküle von Glu-Cys bzw. GSH in PC waren doppelt- bzw. dreifachmarkierte Peptide nötig. Deren enzymatische Herstellung gelang aber nicht in der gewünschten Weise (Kap. III.6.6). Nur ein mit ^3H -Glu und ^{14}C -Gly doppeltmarkiertes GSH (Markierungsverhältnis 10:1) stand zur Verfügung. Um auch die Doppelmarkierung mit ^3H -Glu und ^{35}S -Cys zu simulieren, wurden 5 μCi ^3H -Glu-GSH mit 0,5 μCi ^{35}S -Cys-GSH gemischt. Wenn die einzelnen Moleküle beim Einbau in PC nicht enzymatisch unterschieden werden - und davon war auszugehen -, so sollte sich auch hier bei Einbau intakten Glutathions eine Konstanz des Markierungsverhältnisses ergeben. Diese Substrate wurden dem Medium von Suspensionskulturen von R. serpentina, die mit BSO zur Hemmung der GS I vorbehandelt worden waren, mit DTE versetzt zugegeben. Nach 4 h Aufnahme in die Zellen wurden die Kulturen für 3 Tage mit 200 μM Cd^{2+} belastet.

Tabelle 28 stellt die in diesem Experiment gemessenen Daten zusammen. Auffällig ist, daß hier wie auch schon bei den Einzelmarkierungen der Markierungsgrad der PC-Peptide sehr viel geringer ist als der des Glutathions. Der Markierungsgrad der PC-Peptide selbst entspricht teilweise den bei Synthese aus dem gefütterten Substrat zu erwartenden Zahlen: Der Markierungsgrad mit ^{14}C -Gly nimmt vom PC2 zum PC4 ab (im dargestellten Experiment fällt der Wert für PC3 aus dieser Reihe heraus), während der Markierungsgrad mit ^3H -Glu und ^{35}S -Cys in den einzelnen PC-Peptiden konstant ist. Das Verhältnis der beiden Markierungen in den einzelnen PC-Peptiden entspricht nur bei dem Experiment mit ^3H -Glu/ ^{35}S -Cys den Erwartungen: es ist im Rahmen der Versuchsgenauigkeit konstant.

Substrat	Aufn.%		GSH	PC2	PC3	PC4
^{3}H -Glu-/ ^{14}C -Gly)-GSH		nmol SH ^a	16,5	6,8	39,5	16,2
	0,84(Glu)	dpm/nmol SH	2700	265,5	265,5	208,5
	1,01(Gly)	dpm/nmol SH	360	46,5	75,5	40,6
		Glu/Gly ^b (Theorie:	7,50 10	5,70 20	3,45 30	5,10 40)
^{3}H -Glu)-GSH + (^{35}S -Cys)-GSH		nmol SH ^a	15,6	7,4	40,3	15,2
	0,84(Glu)	dpm/nmol SH	2865	276	267	244,5
	0,30(Cys)	dpm/nmol SH	139	18,2	18,3	11,0
		Glu/Cys ^b (Theorie:	20,5 10	15,2 10	14,6 10	22,2 10)

Tabelle 28

Einbau von doppeltmarkiertem GSH in PC durch Suspensionskulturen von *R. serpentina*, deren GS I mit 0,5 mM BSO gehemmt worden war. A: eingesetzt wurde doppeltmarkiertes (siehe Text) GSH mit 5 μCi ^{3}H -Glu und 0,5 μCi ^{14}C -Gly, B: eingesetzt wurde eine Mischung aus 5 μCi ^{3}H -Glu-GSH und 0,5 μCi ^{35}S -Cys-GSH. Die Substrate wurden mit unmarkiertem GSH auf 3 μmol aufgefüllt und mit 1,5 μmol DTE versetzt. In den Kulturen (30 ml) wurden Endkonzentrationen von 100 μM bzw. 50 μM erreicht. 4 h nach dieser Zugabe wurden die Kulturen mit 200 μM Cd^{2+} belastet. Nach 3 Tagen Belastungsdauer wurden die PC-Peptide über HPLC mit SH-spezifischer Detektion getrennt und das Eluat fraktioniert aufgefangen. a: nmol SH entspricht nmol Glu-Cys-Einheiten in den einzelnen Peptiden. b: Der Quotient aus den Markierungsgraden (dpm/nmol SH) von ^{3}H -Glu/ ^{14}C -Gly bzw. ^{3}H -Glu/ ^{35}S -Cys gibt ein Maß für den Einbau intakter Peptide (siehe Text).

Im Experiment mit der ^{3}H -Glu/ ^{14}C -Gly-Doppelmarkierung hätte das Markierungsverhältnis von 10 im GSH über 20 im PC2 und 30 im PC3 auf 40 im PC 4 zunehmen müssen, um den Einbau des intakten Substrates zu beweisen. Diese Experimente belegen den Einbau von "vorgefertigten", also unabhängig von der PC-Synthese selbst synthetisierten Glu-Cys-Einheiten aus GSH in PC. Der nicht-quantitative Einbau der markierten Peptide schmälert diese Aussage.

Da es keine Möglichkeit gibt, die Glutathionsynthetase selbst spezifisch zu hemmen, kann mit diesen Daten nicht zwischen einem Einbau von Glu-Cys oder GSH als eigentlichem Substrat unterschieden werden. Die trotz Hemmung mit BSO nicht vollständige Reduzierung der GSH-Konzentration auf den Wert 0 und der trotz der Hemmung mit BSO nicht quantitative Einbau der aufgenommenen Radioaktivität in PC könnte damit erklärt werden, daß nicht alles intrazelluläre GSH zu einem gleichmäßig verfügbaren "pool" gehört und die PC-Synthese das Substrat GSH möglicherweise zum Teil aus intrazellulär vorhandenem, nicht nur dem aufgenommenen GSH schöpft.

Die dargestellten Experimente sind individuelle Beispiele, in denen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen verwertet wurden. Aus den Daten unabhängiger, gleichartiger Experimente ließen sich Mittelwerte nicht sinnvoll bilden. Es wurden aber jeweils den dargestellten Beispielen entsprechende Ergebnisse erzielt. Wegen der geringen Aufnahme von nur ca. 1% der Aktivität in die Zellen, und wegen des geringen Einbaus der Aktivität in PC-Peptide mußte bei diesen Analysen mit sehr geringen Zählraten von 100 - 2000 cpm (vor einem Hintergrund von 50 cpm) gemessen werden. Bei solchen Messungen wirken sich geringe Fehler in der Bestimmung der Zählausbeute gravierend aus.

Trotz Variation aller maßgeblichen Versuchsparameter konnte keine höhere Aufnahme der Substrate in die Zellen erzielt werden. Als Beispiel für einen solchen Versuch sei die kinetische Untersuchung des Einbaus von ^{14}C -Gly markiertem GSH in PC in Abbildung 54 gezeigt. Es wurde die Frage untersucht, ob die Markierung der PC-Peptide aus zugeführtem GSH ein Maximum durchläuft, weil z. B. Enzymneusynthese der GS I die Hemmung mit BSO zunichtemacht. Gleichzeitig galt es, die Abnahme der Markierung im Substrat (GSH) und die Zunahme der Markierung im Produkt (PC) zu belegen. Einer Suspensionskultur von R. serpentina waren 5 μCi markiertes GSH zugesetzt worden, bevor die Kultur in aliquote Teile von 1,5 ml in entsprechende Kulturgefäße verteilt wurde.

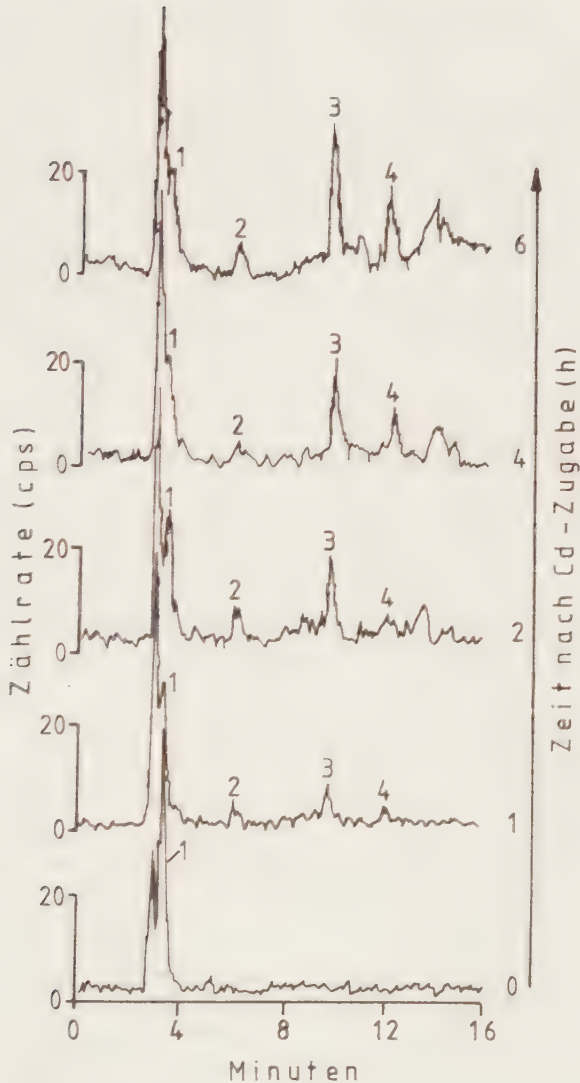


Abbildung 54

Zeitlicher Verlauf des Einbaus von ^{14}C -Gly markiertem GSH in PC durch Suspensionskulturen von *R. serpentina*. Die mit BSO gehemmte Kultur wurde in aliquoten Mengen von 1,5 ml auf entsprechende Kulturgefäße verteilt und Diesen je 1 μCi des markierten Substrates zugegeben (Endkonzentrationen: 1 mM GSH, 100 μM DTE). Nach 1 h wurden die Kulturen mit 200 μM Cd^{2+} belastet und nach den bei den einzelnen Elutionsprofilen angegebenen Zeiten mit HPLC mit Scintillationsdetektion analysiert.

Nach 2 Stunden Aufnahme des Substrates in die Zellen wurden die Kulturen mit $200 \mu\text{M Cd}^{2+}$ belastet. Dann wurden in kurzen Zeitabständen Proben entnommen und analysiert. Zur HPLC-Analyse solcher Reihenuntersuchungen stand eine Anlage mit Szintillationszählung des HPLC-Eluates zur Verfügung (siehe Kap. II). Um in diesem System detektiert zu werden, waren 50-fach höhere Markierungen der Peptide nötig, verglichen mit der Methode der Fraktionierung und Auszählung der Fraktionen im Szintillationszähler. Die Szintillationsmischung mit dem HPLC-Eluat verweilte ja nur wenige Sekunden im Durchfluß-Szintillationszähler, verglichen mit mehreren Minuten im Probenwechsler-Szintillationszähler. Dennoch konnten in günstig gelagerten Fällen radioaktiv markierte PC-Peptide mit dieser Analysenmethode detektiert werden. In Abbildung 54 kann man erkennen, daß die Markierung im GSH (mit 1 bezeichnet) abnahm, während bis zu einer Zeit von 6 Stunden die PC-Peptide (2,3 und 4) zunehmend markiert waren. Das bestätigt die Ergebnisse eines Experimentes von Grill (1987), in dem der Einbau käuflich erworbenen ^{35}S -Cys-Glutathions in PC nachgewiesen wurde.

II.7.4: Fütterung unmarkierter Peptide

Wenn GSH als Substrat die PC-Synthese begrenzt, so sollte ein höherer intrazellulärer GSH-Gehalt eine höhere Syntheserate von PC ermöglichen und damit eine erhöhte Schwermetalltoleranz für die Zellkultur/Pflanze bedeuten. Der intrazelluläre GSH-Spiegel kann durch Erhöhung der Cysteinkonzentration erhöht werden (Heinle et al., 1976, Williamson und Meister (1981). Die Beobachtung, daß nur 2 % von den ca. $10 \mu\text{M}$ Cys in Pflanzenzellen rasch umgesetzt werden (Giovaneli et al., 1978) legt den Schluß nahe, daß die Syntheserate des GSH in Pflanzenzellen von der begrenzenden Konzentration an Cys weit unter dem K_M -Wert des Enzyms bestimmt wird.

Wie sollte nun die intrazelluläre Cys-Konzentration in Pflanzenzellen erhöht werden? Ein Analog des 5-Oxoprolins, das L-2-Oxothiazolidin-4-Carboxylat wurde von Rattennieren aufgenommen und vom Enzym Oxoprolinase gespalten. Während aus Oxoprolin Glutamat gebildet wird, entsteht aus Oxothiazolidin-4-Carboxylat Cystein (Williamson und Meister, 1981) (Abbildung 55). Im Säugetierorgansimus ist extern zugegebenes Cys in Konzentrationen über wenigen μM toxisch, deshalb hat dieses System zur experimentellen Erhöhung der Cystein-konzentration besondere Bedeutung. Dagegen werden sowohl GSH als auch Cys von Tabak-Suspensionskulturzellen aufgenommen (Rennenberg, 1982).

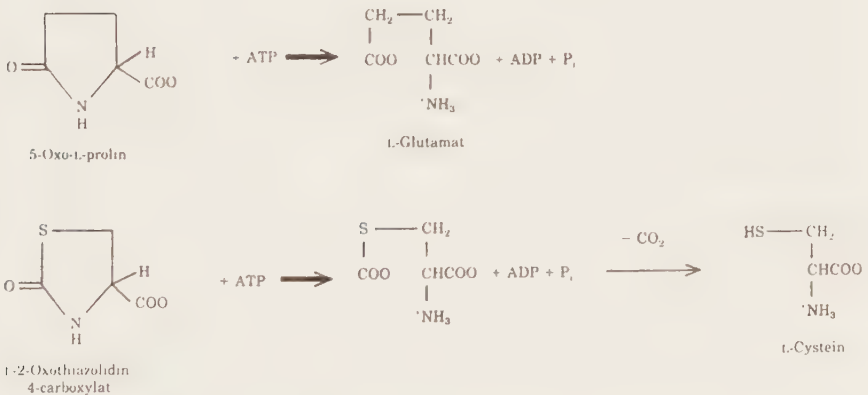


Abbildung 55

Von 5-Oxoprolinase katalysierte Reaktionen von Oxoprolin zu Glutamat und von Oxothiazolidincarboxylat zu Cystein (Williamson und Meister 1981).

Es erschien also sinnvoll, alle 3 Metaboliten - GSH, Cys und Oxothiazolidin-4-Carboxylat - an Suspensionskulturen von R. serpentina zu füttern. Weil sich in ersten Versuchen zur Produktion von hPC mit Suspensionskulturen von Phaseolus aureus und G. max herausgestellt hatte, daß diese Kulturen wesentlich empfindlicher gegenüber Schwermetallen sind als zum Beispiel R. serpentina (siehe Abbildung 11), wurde auch die Suspensionskultur von Phaseolus aureus in die Untersuchungen einbezogen. Die Suspensionskulturen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Oxothiazolidin-4-Carboxylat und Cys, für R. serpentina auch GSH versetzt und nach 8 Stunden Aufnahme der Substrate in die Zellen (und mglw. Erhöhung der GSH-/hGSH-Konzentration) mit steigenden Konzentrationen an Cd^{2+} (0 - 1000 μM für R. serpentina bzw. 0 - 400 μM für P. aureus) belastet. Nach weiteren 2 Tagen Inkubation wurden die einzelnen Zellkulturen auf ihre Gehalte an GSH bzw. Cys und hGSH, sowie die Gehalte an PC-Peptiden und das relative Wachstum untersucht. In den nun folgenden Abbildungen sind die erhaltenen Daten auf verschiedene Weise gegeneinander aufgetragen.

Abbildung 56 zeigt das relative Wachstum und den intrazellulären GSH-Gehalt von Suspensionskulturen von R. serpentina bei Variation der Konzentration an Oxothiazolidin-4-Carboxylat, Cys und GSH im Medium. Das Wachstum der Zellen wurde durch Zugabe aller drei Metaboliten auf 80 - 50 % vermindert. Der GSH-Gehalt konnte durch die Zugabe von 700 μM Oxothiazolidin-4-Carboxylat oder Cystein 15-fach erhöht werden. Bei Zugabe von 0 - 1 mM GSH war festgestellt worden, daß nur eine 1,5- 2-fache Erhöhung der intrazellulären GSH-Konzentration eintrat (von 2,8 auf 4,2 - 5,6 nmol GSH/mg TG) (siehe auch Abbildung 52).

Abbildung 57 stellt die Ergebnisse entsprechender Experimente an Suspensionskulturen von P. aureus dar. Das Wachstum wurde durch Zugabe von Oxothiazolidin-4-Carboxylat nicht beeinflusst, Zugabe von Cys führte zu einer drastischen Wachstumsverminderung auf ca. 20% der Kontrolle. Beide

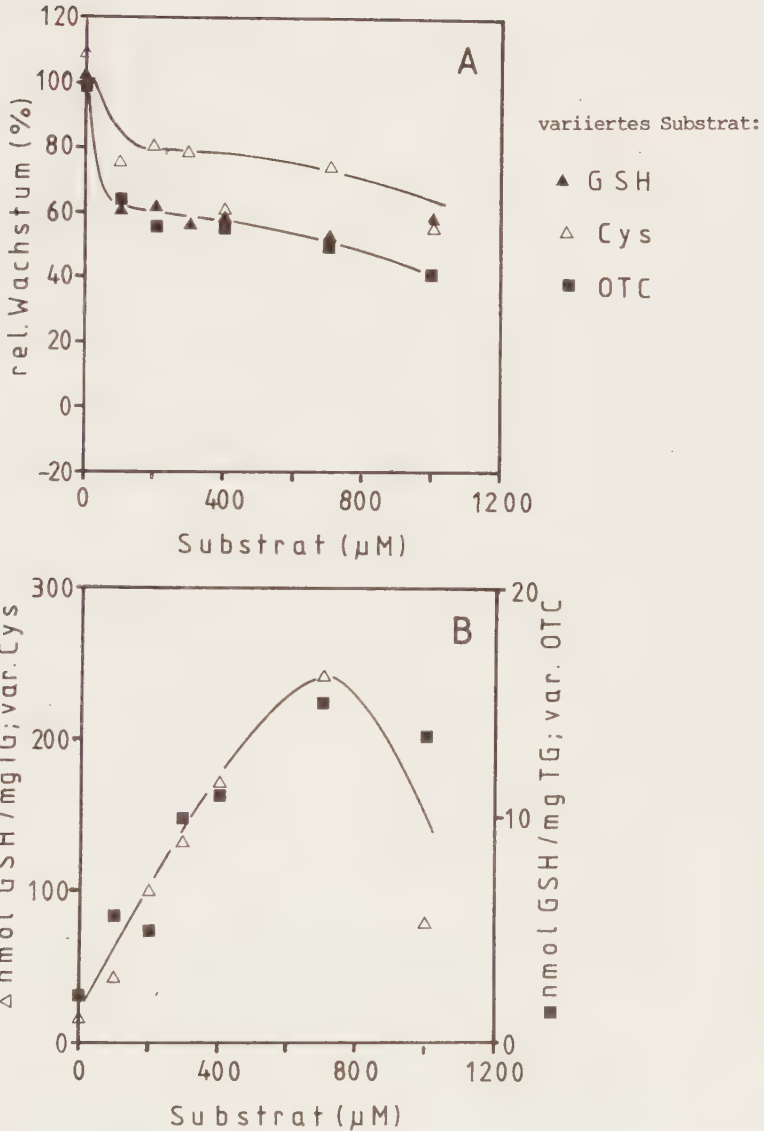


Abbildung 56

Beeinflussung des relativen Wachstums (A) und der intrazellulären GSH-Konzentration (B) von Suspensionskulturen von *R. serpentina* durch steigende Konzentrationen von Cys, GSH und Oxothiazolidincarboxylat (OTC). Bei Fütterung mit Cys wurden mehr als 10-fach erhöhte Werte von GSH gemessen, der Kurvenverlauf ist aber bei Fütterung mit Cys und OTC derselbe und belegt eine 10-fache Erhöhung der intrazellulären GSH-Konzentration durch Zugabe von 700 μM Substrat.

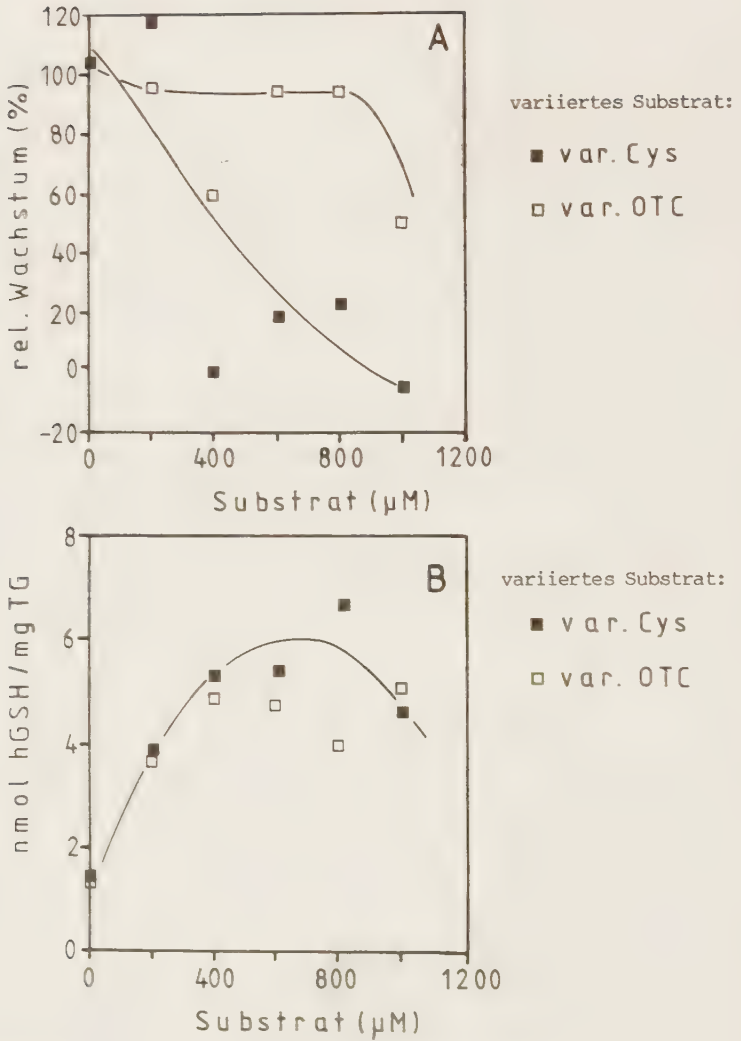


Abbildung 57

Beeinflussung des relativen Wachstums (A) und der intrazellulären hGSH-Konzentration (B) von Suspensionskulturen von *Phaseolus aureus* durch steigende Konzentrationen von Cys und Oxothiazolidincarboxylat (OTC).

Substrate führten zu einer 2,5-fachen Erhöhung der intrazellulären hGSH-Konzentration, mit einem Optimum bei 0,7 - 1 mM Substrat im Medium.

Nun wurde die Auswirkung des erhöhten GSH- bzw. hGSH-Gehalts auf die Schwermetalltoleranz, manifestiert in der Wachsumskurve, und auf die PC-Synthese gemessen. Abbildungen 58, 59 und 60 geben die mit R. serpentina nach Fütterungen mit Oxothiazolidin-4-Carboxylat, resp. Cys und GSH mit anschließender Belastung mit 0 - 1 mM Cd^{2+} erhaltenen Daten wieder.

Die Kultur von R. serpentina konnte durch keine der Fütterungen zu gegenüber der Kontrolle erhöhter PC-Induktion in Abhängigkeit von der Belastung mit Cd^{2+} gebracht werden, im Gegenteil: die Zugabe von 40 bzw. 100 μM Oxothiazolidin-4-Carboxylat oder GSH verminderte die PC-Induktion auf 50 bzw. unter 25 % des Kontrollwertes (Abbildungen 58 B und 60 B). Besonders deutlich war die Verminderung bei Zugabe von 100 μM Cys (Abbildung 59 B): hier wurden weniger als 10 % der PC-Synthese der Kontrollkultur festgestellt. Noch höhere Konzentrationen von Cys und Oxothiazolidin-4-Carboxylat im Medium (700 μM waren optimal zur Erhöhung des GSH-Gehaltes in unbelasteten Zellen) führten zur Unterdrückung der PC-Synthese. Die Wachstumskurven in Abhängigkeit von der Belastung mit Cd^{2+} zeigten eine gegenüber der Kontrolle veränderte Form: Die bereits erwähnte Verminderung des Wachstums der unbelasteten Kulturen (durch Oxothiazolidin-4-Carboxylat, Cys und GSH) wurde mit steigender Belastung mit Cd^{2+} geringer. Bei Zugabe von Cys war das Wachstum bei allen Cd^{2+} -Konzentrationen ab 200 μM über den Kontrollwert erhöht (Abbildung 59 A). Bei Fütterung von GSH war das im Bereich von 400 - 600 μM Cd^{2+} der Fall (Abbildung 60 A), Oxothiazolidin-4-Carboxylat vermochte das Wachstum nicht über den Kontrollwert zu erhöhen (Abbildung 58 A).

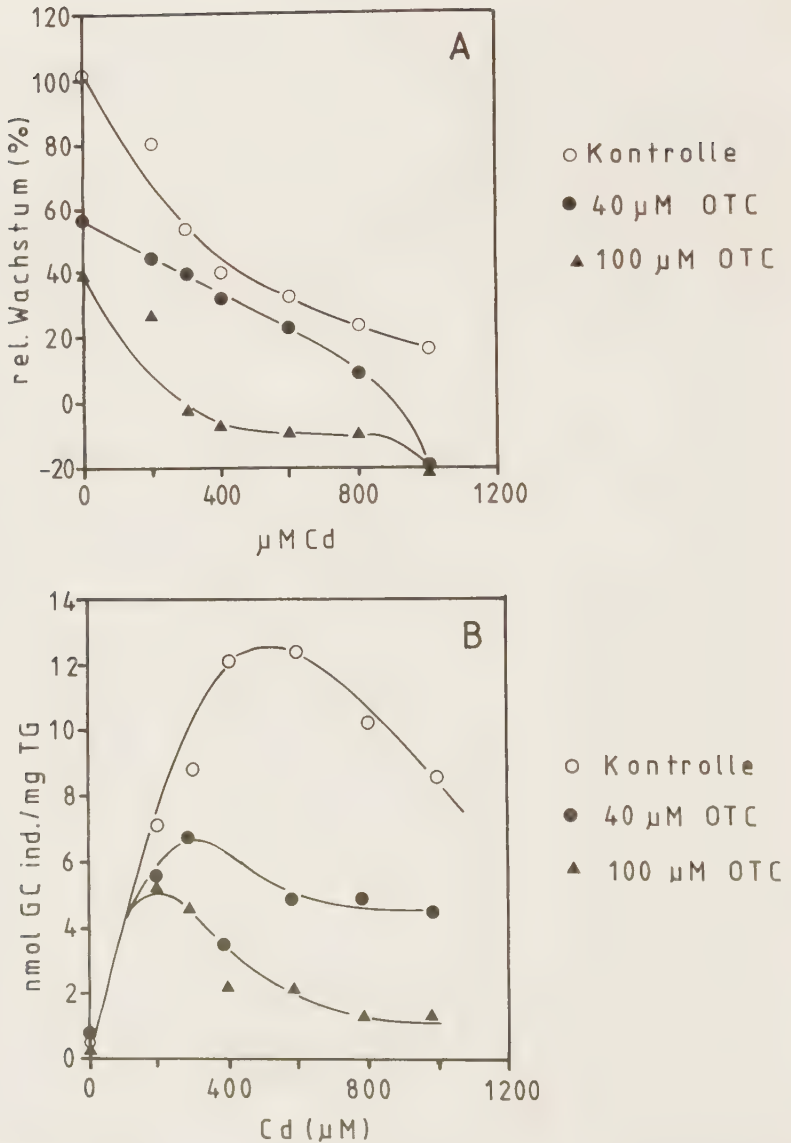


Abbildung 58

Beeinflussung des relativen Wachstums (A) und der PC-Induktion (B, in nmol Glu-Cys-Einheiten) in Cd^{2+} -belasteten Suspensionskulturen von *R. serpentina* in Abhängigkeit der Konzentration von Oxothiazolidincarboxylat (OTC).

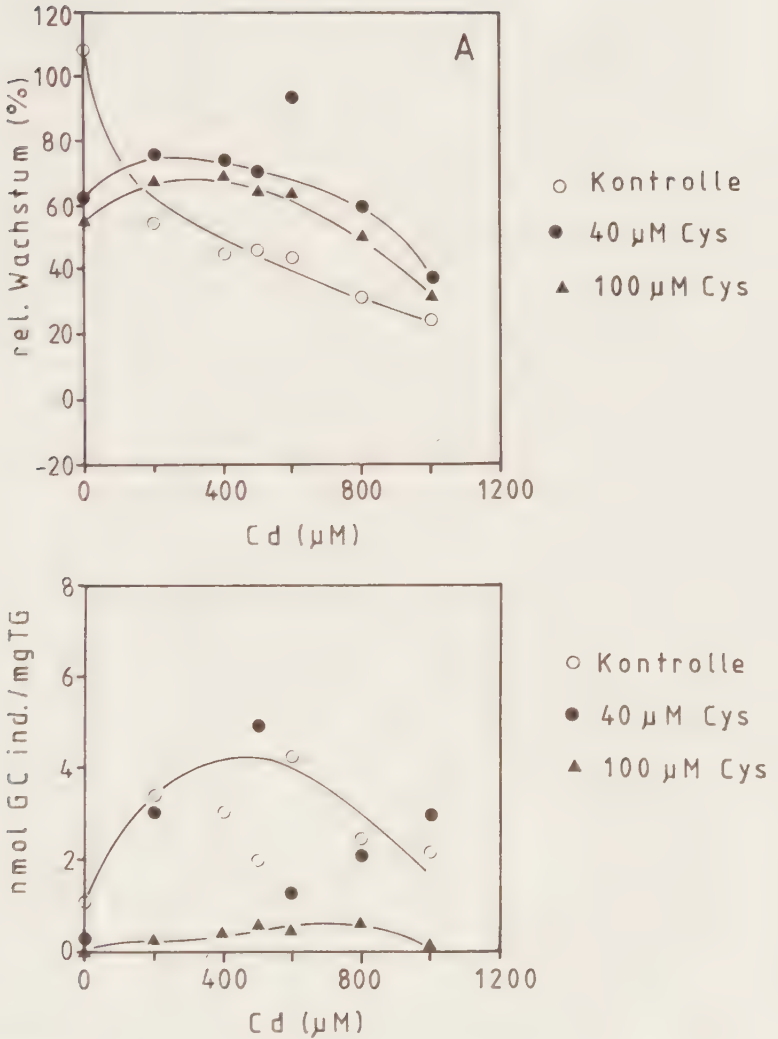


Abbildung 59

Einfluss des relativen Wachstums (A) und der PC-Induktion (B, in nmol Glu-Cys-Einheiten) in Cd^{2+} -belasteten Suspensionskulturen von R. serpentina in Abhängigkeit der Konzentration von Cystein.

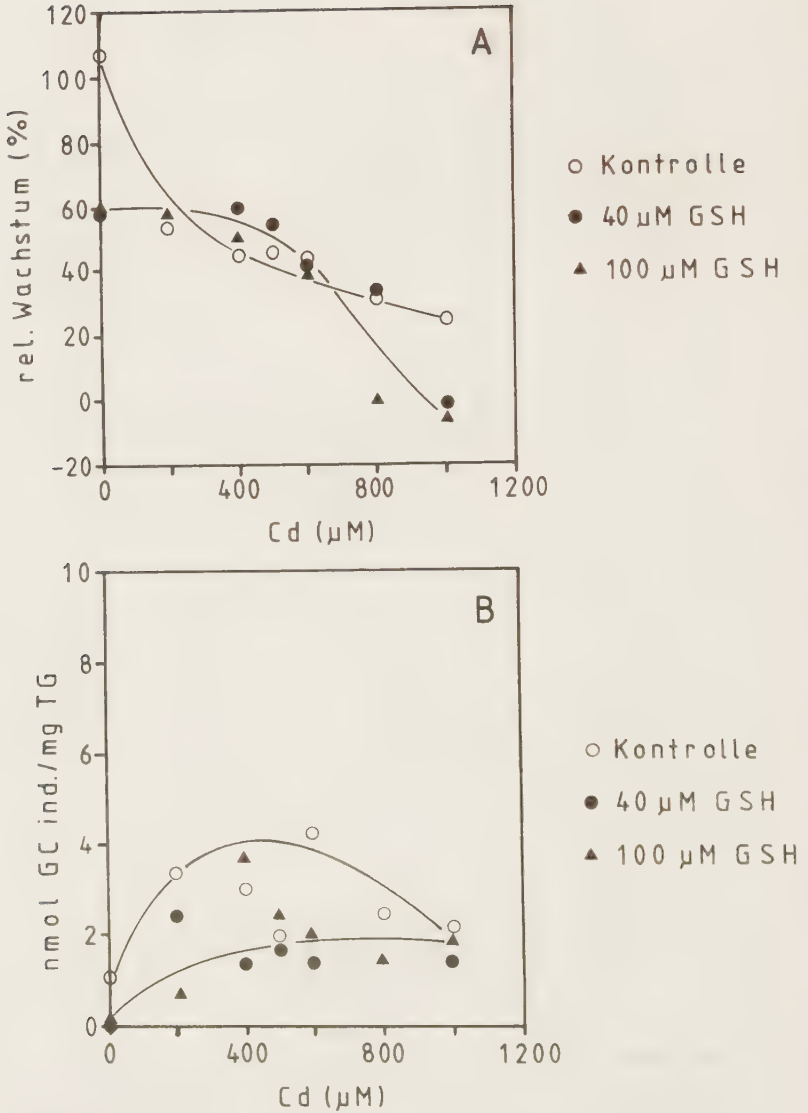


Abbildung 60

Beeinflussung des relativen Wachstums (A) und der PC-Induktion (B, in nmol Glu-Cys-Einheiten) in Cd^{2+} -belasteten Suspensionskulturen von R. serpentina in Abhängigkeit der Konzentration von GSH.

Abbildungen 61 und 62 zeigen die Ergebnisse entsprechender Experimente an Suspensionskulturen von Phaseolus aureus. Die Zugabe von 40 μM Oxothiazolidin-4-Carboxylat ermöglichte eine verglichen mit der Kontrollkultur fast doppelt so hohe hPC-Synthese bei allen Cd^{2+} -Belastungen zwischen 50 und 400 μM (Abbildung 61 B). Auch die Zugabe von 40 bzw. 100 μM Cys erhöhte die hPC-Induktion gegenüber der Kontrolle bei Belastung mit Cd^{2+} -Konzentrationen über 200 μM , bis zu 5-fach bei Fütterung mit 100 μM Cys und Belastung mit 400 μM Cd^{2+} (Abbildung 62 B).

Das relative Wachstum der Suspensionskulturen von P. aureus wurde durch 40 μM Cys, noch stärker durch 100 μM Cys im unbelasteten Zustand und bis 200 μM Cd^{2+} -Belastung gegenüber der Kontrollkultur ohne Substratfütterung vermindert, bei Belastung mit über 400 μM Cd^{2+} zeigte sich eine geringfügige Erhöhung des relativen Wachstums gegenüber der Kontrollkultur. Diese Tendenzwende wird nicht dadurch hervorgerufen, daß noch im Medium befindliches Cys mit dem Cd^{2+} zu Mercaptiden reagiert und damit die schädliche Wirkung des Cys aufgehoben wird. Vorversuche hatten gezeigt, daß bereits vor Zugabe zu Suspensionskulturen gemischte äquimolare Mengen Cd^{2+} und Cys gleich toxisch für Suspensionskulturzellen sowohl von R. serpentina als auch Phaseolus aureus waren. Rechnet man die ermittelten Daten der hPC-Induktion auf den Gehalt pro Liter Kultur um, so ergibt sich für eine Fütterung mit 40 μM Oxothiazolidin-4-Carboxylat bei Belastung mit 100 μM Cd^{2+} eine Erhöhung von 3,2 mg PC-Peptide /Liter Kultur auf 6,2 mg/Liter, fast das Doppelte des Wertes in der Kontrollkultur, die kein Oxothiazolidin-4-Carboxylat erhalten hatte. Die Zugabe von 100 μM Cys führt bei Belastung mit 300 μM Cd^{2+} zu einer hPC-Synthese von 2,5 mg/Liter, gegenüber 0,5 mg/Liter in der Kontrollkultur. Der bei diesen Belastungen verminderte Biomassenzuwachs macht den Vorteil der 5-fach erhöhten hPC-Synthese wieder zunichte. Die Ausbeute an hPC aus Suspensionskulturen von Phaseolus aureus ist bei einer Belastung von 100 μM Cd^{2+} und Zugabe von 40 μM Oxothiazolidin-4-Carboxylat optimal.

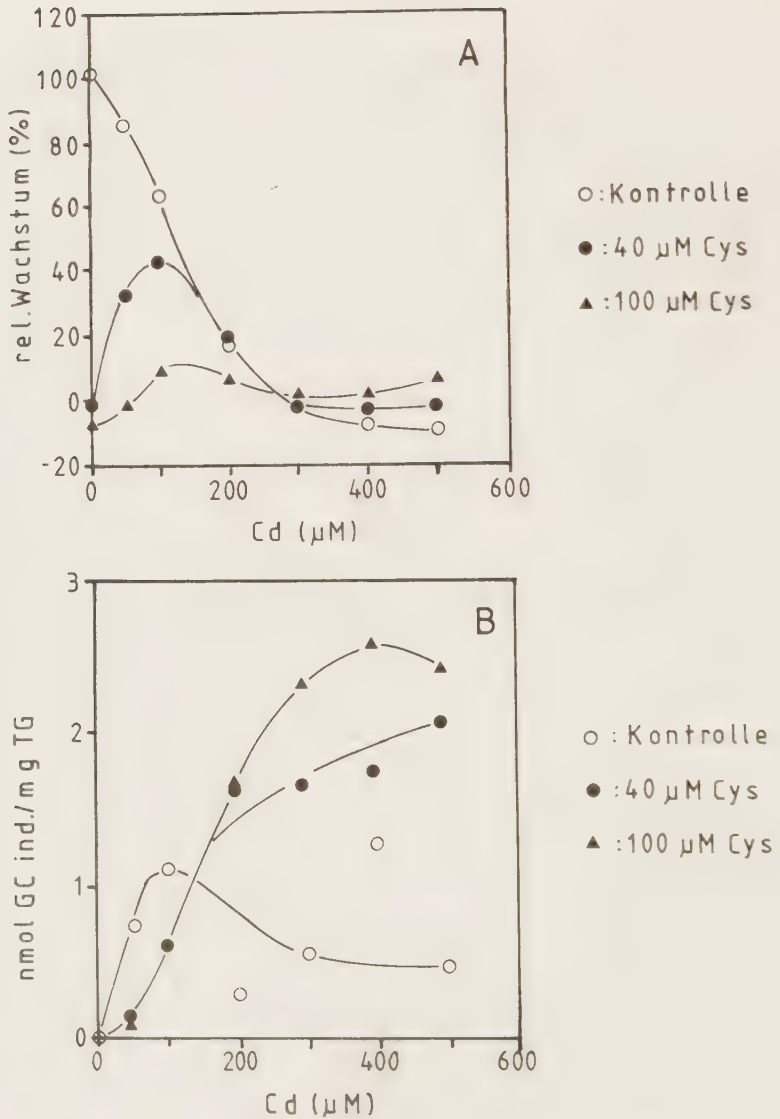


Abbildung 61

Beeinflussung des relativen Wachstums (A) und der PC-Induktion (B, in nmol Glu-Cys-Einheiten) in Cd^{2+} -belasteten Suspensionskulturen von *Phaseolus aureus* in Abhängigkeit der Konzentration von Oxothiazolidin-carboxylat (OTC).

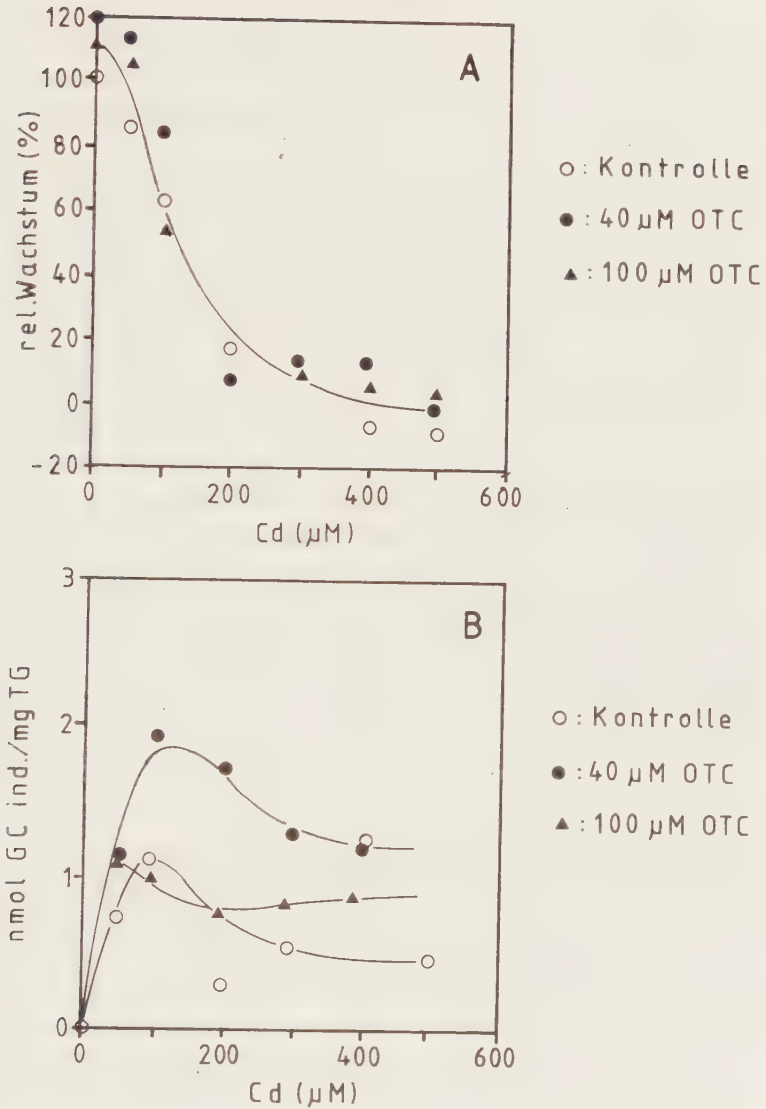


Abbildung 62

Beeinflussung des relativen Wachstums (A) und der PC-Induktion (B, in nmol Glu-Cys-Einheiten) in Cd^{2+} -belasteten Suspensionskulturen von *Phaseolus aureus* in Abhängigkeit der Konzentration von Cystein.

IV. Diskussion

IV.1. Komplexieren alle Pflanzen Schwermetalle mit dem PC-System?

Das schwermetallkomplexierende Protein Metallothionein (MT) wurde zuerst von Margoshes und Vallee (1957) beschrieben. Seither wurde dieses Protein genau charakterisiert, die Veröffentlichungen der ersten Primärstruktur (Kojima et al. 1976), einer ersten Gensequenz (Durnam et al. 1980) und der ersten Röntgenstrukturanalyse (Furey et al. 1986) waren und sind die Grundlage für ein genaues Wissen über die Struktur von MT. MT-Proteine sind im Tierreich und in Mikroorganismen weit verbreitete und stark konservierte Proteine, was ihre generelle und prinzipielle Bedeutung belegt (Übersicht hierzu in Kägi und Nordberg 1979). Angesichts dieser Daten ist es logisch, daß viele Autoren versuchten, auch in Pflanzen MT-Proteine nachzuweisen (Premakumar et al. 1975, Casterline und Barnett 1977, Weigel und Jäger 1980, Rauser und Curvetto 1980, Bartolf et al. 1980, Wagner und Trotter 1982, Rauser et al. 1983, Wagner 1984, Rauser 1984, Lolkema et al. 1984).

Dann aber entdeckten und charakterisierten Grill et al. (1985 a, 1985 b) schwermetallkomplexierende Peptide, die **PHYTOCHELATINE** (PC) in Zellkulturen einiger Pflanzen der Dicotyledonae, Monocotyledonae und Gymnospermae, in differenzierten Pflanzen (Grill 1987) sowie in Schizosaccharomyces pombe (Grill et al. 1986 a) und widersprachen damit den oben zitierten Arbeiten. Grill (1987) konnte zeigen, daß der von Bartolf et al. (1980) aus Tomaten isolierte Komplex genau wie der von Wagner (1984) aus Rotkohl, und der von Fujita (1985) aus Wasserhyazinthen isolierte Komplex in Wirklichkeit PC war.

Das wichtigste Unterscheidungsmerkmal zwischen MT und PC ist das Auftreten von γ -Glutamylbindungen in PC, die eine ribosomale Synthese und damit die Proteinnatur des SM-bindenden Liganden ausschließen. Mit den Phytochelatinen ist neben

bakteriellen Zellwandpeptiden und z. B. Gramicidin und Oxytocin eines der wenigen Beispiele für enzymatisch synthetisierte Oligopeptide bekanntgeworden (Grill 1987).

Zunächst sollen nun einige Arbeiten erwähnt werden, deren Autoren nach der Veröffentlichung der Entdeckung der Phytochelatine durch Grill et al. (1985 a) ihre Auffassung von einer Proteinnatur des Liganden der pflanzlichen SM-bindenden Komplexe korrigierten. Die Synthese schwermetallbindender Komplexe in Datura stramonium-Zellkulturen wurde als eine von Poly-A⁺-RNA abhängige Reaktion beschrieben, was die Proteinnatur des Liganden belegen sollte und γ -Glutamylbindungen ausschließen würde (Jackson et al. 1984). Nach den Arbeiten von Grill et al. (1985 a) wurde jedoch das Auftreten von γ -Glutamylbindungen in den Komplexen aus D. stramonium festgestellt und die Komplexierung von Schwermetallen durch PC bestätigt (Jackson et al. 1986).

Fujita und Kawanishi (1986) untersuchten den Cd-bindenden Komplex aus Wasserhyazinthen genauer und fanden, daß der Ligand nur aus Glu, Cys und Gly in einem molaren Verhältnis von 10 : 10 : 4 zusammengesetzt ist. Diese Aminosäurezusammensetzung hatten Grill et al. (1985 a) in PC aus R. serpentina gefunden. Das Molekulargewicht von 4000 Da bei neutralem pH wurde kleiner beim Ansäuern oder Behandeln mit Mercaptoethanol. Diese Behandlungen dissoziieren PC-Komplexe in die monomeren Peptide. Tatsächlich ergeben zum Beispiel zwei Moleküle PC₂, zwei Moleküle PC₃ und die damit komplexierten fünf Ionen Cd²⁺ ein Molekulargewicht von 3900 Da in perfekter Übereinstimmung mit den von Fujita und Kawanishi (1986) gemessenen Daten.

Reese und Wagner (1987 a) bestätigten, daß das aus Tabak-Suspensionskulturzellen und differenzierten Pflanzen erhaltene Cd-bindende Material identisch mit dem von Grill et al. (1985 a) charakterisierten Phytochelatinen ist, und nicht ein MT-ähnliches Protein, wie es aus Rotkohl beschrieben worden war (Wagner, 1984). Robinson et al. (1986) bean-

spruchen gar die Charakterisierung der "Schwermetall-bindenden Peptide aus Cadmium-resistenten Pflanzenzellen" für sich.

Manche Autoren beharren aber auch auf der Proteinnatur des von ihnen isolierten Komplexes. Kaneta et al. (1986) isolierten Schwermetall-bindende Komplexe aus Reis und Weizenkeimlingen, die mit Pb, Cd, Ni und Cu-Ionen belastet worden waren. Diese Komplexe hatten die typische Absorption bei 254 nm, einen wesentlich höher anionischen Charakter als MT und Molekulargewichte zwischen 5000 und 33100 Da. Diese Charakteristika wurden als Indiz für ein MT-ähnliches Protein gewertet; sind aber besser mit PC-Komplexen vereinbar.

Blakeley et al. (1986) isolierten ein "Protein" von 14 kDa aus Sojabohnen, das sich in eine Substanz von weit unter 3800 Da überführen ließ. Robinson und Thurmann (1986) bezeichneten den in Mimulus guttatus für Cu-Resistenz verantwortlichen Komplex als "MT-ähnlich", im Gegensatz zu den Erkenntnissen derselben Arbeitsgruppe in Robinson et al. (1986).

Haben diese Autoren in den untersuchten Einzelfällen recht, oder sind SM-bindende Komplexe aus Pflanzen prinzipiell Phytochelatin-Komplexe? Grill et al. (1985 a, 1986 b, 1987) und Grill (1987) postulierten eine Ubiquität des Phytochelatinsystems bei den höheren Pflanzen. PC-Komplexe in jeder einzelnen interessierenden Pflanzenart durch Isolierung und Sequenzierung nachzuweisen wäre sehr aufwendig und nach einem Nachweis der ubiquitären Verbreitung des PC-Systems auch unnötig.

Was außer der Sequenzierung könnte als Beweis für PC-Synthese akzeptiert werden, und ab welcher Zahl untersuchter Spezies ist die Ubiquität nachgewiesen? Eine nicht abschließend zu beantwortende Frage, die während der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen ständig zu stellen war. Es wurde davon ausgegangen, daß die in allen von Grill (1987) untersuchten Pflanzen festgestellte ausschließ-

liche Bindung von Schwermetallen in PC auch in allen weiteren Pflanzen erfüllt ist, von denen im Rahmen eines eingehenden "screenings" in der vorliegenden Arbeit nur die Fähigkeit zur PC-Synthese nachgewiesen wurde. Dieser Nachweis konnte über HPLC-Analyse mit SH-spezifischer Detektion von entproteinisierten Rohextrakten Cd^{2+} -belasteter Pflanzen geführt werden.

Die drei Teilschritte dieser Analyse - Anzucht von Keimlingen in Hydrokultur, die "Schnellaufschlußmethode" und die SH-spezifische HPLC-Analyse - zu erarbeiten, bedeutete jeweils einen Durchbruch in Richtung auf die letztlich erfolgreiche "screening"-Methode. Die Schnellaufschlußmethode wurde von E. Grill, die HPLC-Analyse in Zusammenarbeit mit E. Grill entwickelt. Das damit durchgeführte "screening" kann nicht den Anspruch auf Vollständigkeit erheben, aber da die überwiegende Mehrzahl der Ordnungen des Pflanzenreichs untersucht und Ausnahmslos die Fähigkeit zur PC-Synthese an einigen, häufig vielen Vertretern einer jeden untersuchten Ordnung nachgewiesen wurde, kann mit Sicherheit auf ein ubiquitäres Vorkommen dieser Eigenschaft geschlossen werden. Die Fähigkeit zur PC-Synthese konnte in 98 Arten aus 48 verschiedenen Ordnungen der Dicotyledonae, sowie in 69 Arten von Fabales (die wegen des Vorkommens von hGSH in dieser Ordnung gesondert untersucht wurden) nachgewiesen werden. Auch in 23 Arten aus 13 Ordnungen der Monocotyledonae, 5 Arten aus 3 Ordnungen der Gymnospermae und 6 Arten aus 5 Klassen der Sporophyta wurde PC-Synthese nachgewiesen. Dies erlaubt den Schluß, daß mit Sicherheit alle Pflanzen - differenziert und als Gewebekultur - nach Belastung mit Schwermetallen PC synthetisieren. In Spermatophyta ist PC-Synthese mit Sicherheit der wesentliche SM-Komplexierungsmechanismus.

Die untersuchten Vertreter der Sporophyta zeigten ein experimentell schwerer zugängliches Verhalten in den Versuchen zum Nachweis der PC-Synthese in differenziertem Zustand. Eine Gewebekultur von Equisetum giganteum ließ sich in den

Suspensionskulturen höherer Pflanzen entsprechender Weise zur PC-Synthese induzieren. Im Gegensatz dazu ist die Schwermetallaufnahme und PC-Synthese in differenzierten Pflanzen dieser Art im Vergleich zu höheren Pflanzen geringer. Auch bei anderen (nur als differenzierte Pflanzen untersuchten) Vertretern der Sporophyten wurde nur geringe PC-Synthese gefunden, selbst Freisetzung von im Substrat festgelegten Schwermetallen durch Verdrängung mit Al^{3+} führte verglichen mit einer höheren Pflanze (Linum usitatissimum) nur zu geringer PC-Synthese.

Auch für die in einigen Vertretern der Fabales in der vorliegenden Arbeit entdeckten und von Grill et al. (1986 b) charakterisierten Homo-Phytochelatine (hPC) ist mit den dargestellten Ergebnissen aus differenzierten Pflanzen und Suspensionskulturen nachgewiesen, daß diese für Homogluthion-haltige Pflanzen die wesentliche Bindungsform für Schwermetalle darstellen und dem PC funktionell entsprechen. Das belegt auch die Induktion von hPC durch viele verschiedene Schwermetalle, die eingehend untersucht wurde. Es wurden im Wesentlichen die von Grill et al. (1985 b) an R. serpentina erhaltenen Ergebnisse bestätigt und die Palette von Induktoren um einige Beispiele erweitert. Auch für die SM-bindenden Komplexe aus hGSH-haltigen Fabaceen, die von anderen Arbeitsgruppen als MT-ähnliche Proteine beschrieben wurden, muß angenommen werden, daß es sich in Wirklichkeit um hPC-Komplexe handelte. Beispielsweise stellten Blakeley et al. (1986) in Sojabohnen nach Belastung mit Cd^{2+} die 60-fache Induktion eines 14 kDa schweren Cd-bindenden "Proteins" fest. Das carboxymethylierte Protein zeigte auf der Elektrophorese eine Mobilität, die weit höher als die des kleinsten Vergleichsproteins (3400 Da) war. Das "Protein" enthielt Cd und Cystein, aber nicht Methionin.

Frühere Untersuchungen von Weigel und Jäger (1980) sowie Casterline und Barnett (1982) hatten dem Cd^{2+} -bindenden Komplex aus Sojabohnen ein Molekulargewicht zwischen 5000 und 10000 Da zugeschrieben, Cataldo et al. (1981) sogar über

10000 Da. Yoshida (1986) untersuchte Sojabohnen von einem Cd-vergifteten Feld, das Schwermetall war mit Proteinen des Molekulargewichts 22000, 10000 und 9200 assoziiert. Die haupt-Cd-Komponente ergab in denaturierenden und nicht-denaturierenden Acrylamidelektrophoresegelen eine hoch anionische Bande, entsprechend einem M_r von 9000 Da. Grünhage et al. (1985) isolierten ein Cd-bindendes Protein aus Erbsen, das ein Molekulargewicht von 6000 - 10000 Da sowie ein UV-Spektrum entsprechend dem von MT aufwies. UV-Spektren ähnlich MT und ein M_r über 5000 genügen aber nicht, die Proteinnatur des SM-bindenden Liganden nachzuweisen. Durch die starke Abhängigkeit des M_r von der Salzkonzentration, die zu Messungen von 3 kDa bei hoher Ionenstärke bis zu 20 kDa bei niedriger Ionenstärke reicht (Lue-Kim und Rauser, 1986, Grill et al. 1987), sind Fehlinterpretationen leicht zu erklären. Die uneinheitlichen Daten der Charakterisierungsversuche, vor allem die Korrekturen des M_r nach kleineren Werten zeigen, daß möglicherweise nicht ein definiertes Protein, sondern hPC- bzw. PC-Komplexe untersucht und nicht korrekt charakterisiert wurden.

Auch in den Fabales, wie für die anderen Samenpflanzen dargelegt, muß die Fähigkeit zur PC-/hPC-Synthese gleichzeitig die hauptsächliche Komplexierung von Schwermetallen in Phytochelatin-komplexen bedeuten. Dies wurde an einigen Beispielen belegt: differenzierte Pflanzen von G. max (Grill et al. 1986 b), Cicer arietinum und Suspensionskulturen von R. pseudacacia, G. max und P. aureus komplexieren 60 - 90% der aufgenommenen Schwermetalle in hPC- bzw. PC-/hPC-Komplexen. Die in den Suspensionskulturen synthetisierten Komplexe bestanden hauptsächlich aus hPC2, hPC3 und hPC4 und zeigten in der Gelfiltration ein deutlich kleineres M_r als Komplexe aus z. B. R. serpentina mit Anteilen höherer homologer Peptide. Bei Ultrafiltration der Komplexe mit kürzerkettigen Peptiden wurden hohe Verluste festgestellt. Offensichtlich sind diese Komplexe nicht so inert wie PC-Komplexe aus R. serpentina, sondern liegen zu einem verglichen mit PC aus R.

serpentina höheren Anteil dissoziiert in einem Gleichgewicht mit intaktem Komplex vor. In der Ultrafiltration werden freie Peptide und Cd^{2+} aus dem Gleichgewicht entfernt. Für die Isolation der hPC-Komplexe mit Cd^{2+} , Ga^{3+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} und Cu^{2+} wurde eine modifizierte Reinigungsvorschrift erarbeitet. Proteine wurden mit Ethanol weitgehend ausgefällt, zur vollständigen Reinigung waren zwei Gelfiltrationsschritte nötig. Es konnten hPC-Komplexe mit fast der selben Reinheit und Ausbeute, wie PC-Komplexe aus R. serpentina erhalten werden.

Welche Angehörigen der Fabales synthetisieren nun PC, welche hPC? Diese Frage wurde mit einer eingehenden Untersuchung der PC-Synthese in 59 Arten aus allen 12 Triben der Fabaceen, 6 Arten aus 4 Triben der Caesalpiniaceen und 4 Arten aus 4 Triben der Mimosaceen untersucht. Das Vorliegen von GSH, hGSH oder eines Gemischs aus beiden determinierte die Synthese von PC, hPC oder eines (an "Doppelpeaks" in der HPLC-Analyse erkennbaren) Gemischs aus beiden. Während alle untersuchten Vertreter der Caesalpiniaceen und Mimosaceen, sowie Angehörige der Triben Podalyrieae, Sophoreae und Genisteae der Fabaceen GSH enthielten und PC synthetisierten, wurde in den Phaseoleae fast ausschließlich hPC-Synthese gefunden. In verschiedenen Vertretern der Galegeae wurde PC-hPC- und gemischte Synthese gefunden. Auch die Dalbergieae, Loteae, Vicieae und Coronilleae (alles Triben der Fabaceen) sind hinsichtlich der PC-/hPC-Synthese uneinheitlich; Pflanzen mit PC-/hPC-Gemisch kommen neben solchen mit nur PC- oder hPC-Synthese vor. Das Vorkommen von GSH/PC- bzw. hGSH/hPC-Synthese fällt also nicht vollständig mit der nach klassischen Merkmalen vorgenommenen Einteilung der Fabales zusammen (siehe Abbildung 10). Die Gattung Vigna zum Beispiel, deren Einteilung umstritten ist (Kasai et al. 1986), ist auch hinsichtlich der PC/hPC-Synthese uneinheitlich. Vigna radiata (Vigna radiata (Wilczek) = Phaseolus aureus (Roxby) = Phaseolus radiatus (Schimpp)) und Vigna umbellata synthetisieren hPC, die anderen untersuchten Arten von Vigna

synthetisieren PC. Die Synthese von hPC und nicht von PC ist ein weiteres Argument für die Einordnung der Mungobohne als Art von Phaseolus, nicht von Vigna. Für die Fabales kann demnach das Auftreten von GSH/hGSH durchaus auch als taxonomisches Merkmal verwendet werden. GSH bzw. hGSH, Produkte des Primärstoffwechsels, haben eine grundlegende Bedeutung für den Zellstoffwechsel (Rennenberg 1982), ebenso wie das PC- bzw. hPC-System zur Komplexierung von Schwermetallen.

IV.2. Ist das PC-System charakteristisch für das Pflanzenreich, und welche Organismen umfaßt das Pflanzenreich nach diesem Kriterium?

Zum Nachweis der PC-Synthese im gesamten Pflanzenreich gehörte unbedingt die Untersuchung der Schwermetallkomplexierung in Algen. Der Mechanismus der Schwermetall-Komplexierung in Algen ist wegen der wachsenden Bedeutung von Algenprotein für die Ernährung einer wachsenden Weltbevölkerung und wegen der besonderen Fähigkeit zur Anreicherung von Schwermetallen durch Algen von besonderem Interesse (Becker 1986). In Algen wurden erhebliche Anreicherungen, mehrere Größenordnungen gegenüber dem umgebenden Medium, von verschiedenen Schwermetallen (Pb, Cd, Hg, As) gefunden. Diese Anreicherung stellt eine mögliche Gefahr für den Konsumenten vermeintlich besonders gesunder Algenprotein-Produkte dar und ist nur durch Wachstum von Algen in schwermetallfreien Medien zu vermeiden (Becker 1986).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis geführt, daß die Grünalge Chlorella fusca Cd^{2+} ausschließlich durch Synthese von Phytochelatinpeptiden komplexiert. Wegen der großen phylogenetischen "Entfernung" zwischen Algen und Kormophyten genügte hier nicht der Nachweis der Fähigkeit zur PC-Synthese, sondern die PC-Peptide mußten sequenziert werden. Der Komplex aus C. fusca ließ sich in einzelne Peptide auftrennen, deren Aminosäureanalyse ergab nur Glu, Cys und Gly in den für PC-Peptide charakteristischen Molver-

hältnissen. Der Komplex war also in reiner Form isoliert worden. Die Sequenzierung mit den beiden von Grill (1987) beschriebenen Methoden der zweidimensionalen Dünnschicht-chromatographie ("fingerprint") und des enzymatisch/chemischen Abbaus belegte zweifelsfrei die Identität dieser Peptide mit PC aus höheren Pflanzen. PC-Synthese wurde außer in C. fusca auch in 10 weiteren Arten aus 6 Klassen der Phyco-phyta gefunden. Aus diesen Daten ist zu schließen, daß die Fähigkeit zur PC-Synthese auch bei eukaryontischen Algen ubiquitär verbreitet ist und deren wesentlichen SM-Komplexierungsmechanismus darstellt (Gekeler et al. 1988).

Frühere Untersuchungen zur SM-Komplexierung in Algen hatten, wie bei höheren Pflanzen, zu uneinheitlichen Ergebnissen geführt. Das von Stokes et al. (1977) in einem Cu-toleranten Stamm von Scenedesmus acutiformis beschriebene Cu-bindende "Protein", und die Cd²⁺-bindenden "Proteine" aus Chlorella pyrenoidosa (Hart und Bertram 1980) und Chlorella ellipsoidea (Nagano et al. 1982, 1984) sowie Cd-bindende Proteine I und II aus Euglena gracilis (Gingrich et al. 1986) waren vermutlich PC-Komplexe. Die Aminosäureanalysen dieser "Proteine" weisen den für PC charakteristischen hohen Gehalt an Glu, Cys und Gly aus. Daneben wurden weitere Aminosäurereste identifiziert, die vermutlich Kontaminationen durch Proteine reflektieren.

Ein weiteres Indiz dafür, daß die früher untersuchten SM-bindenden Komplexe aus Algen PC-Komplexe waren, ist das Vorkommen von freiem Sulfid in PC-Komplexen. In den Cd²⁺-bindenden Komplexen aus S. pombe (Murasugi et al. 1983, Hayashi et al. 1986) und aus E. gracilis (Weber et al. 1987) war freies Sulfid gefunden worden. In reinen PC-Komplexen aus C. fusca, R. serpentina und G. max konnte S²⁻ zweifelsfrei identifiziert und quantifiziert werden (Kap. III.3), was die Befunde von Weber et al. (1987) bestätigt und dieses Phänomen erstmals auch an PC-Komplexen aus höheren Pflanzen nachweist. Hayashi et al. (1986) hatten vermutet, daß das

freie Sulfid als säurelabiler Schwefel wie in Eisen-Schwefel-Proteinen komplexiert vorliegt und einen entsprechenden Strukturvorschlag gemacht. Diese Struktur sei fester Bestandteil des Peptidkomplexes aus S. pombe und kennzeichnend für die SM-bindenden Komplexe von Mikroorganismen, im Gegensatz zum MT, das keinen säurelabilen Schwefel enthält (Kägi und Nordberg 1979). Die Möglichkeit, daß der säurelabile Schwefel in Strukturen ähnlich den Eisen-Schwefel-Proteinen lokalisiert ist, wurde nicht ausgeschlossen. Die stark schwankenden Anteile freien Sulfids in verschiedenen Isolat-ten aus verschiedenen Organismen aber belegen, daß dies nicht fester Bestandteil der Struktur des Komplexes ist, sondern von den jeweiligen Kulturbedingungen und dem jeweiligen Organismus abhängt. Dieses Phänomen ist nicht auf den Komplex aus niederen Eukaryonten beschränkt, sondern tritt auch in höheren Pflanzen auf.

Die PC-Synthese läßt sich, wie in höheren Pflanzen, auch in Algen durch eine Vielfalt von SM-Ionen induzieren. Die relative Stärke dieser Induktionen ist gegenüber den höheren Pflanzen verändert. Die festgestellte Induktion des PC durch Zn^{2+} ist zu den Literaturdaten kontrovers. Zn^{2+} , das in höheren Pflanzen die PC-Synthese drastisch induziert, wirkte bei C. fusca nur schwach induzierend, so daß dieses Phänomen nur mit der empfindlichen HPLC-Analyse quantitativ erfaßt werden konnte. Hart und Bertram (1980), Nagano et al. (1982) und Gingrich et al. (1986) hatten - möglicherweise wegen zu unempfindlicher Analysenmethoden - keine Induktion der SM-bindenden "Proteine" durch Zn^{2+} beobachtet. Die Tatsache, daß auch Cu^{2+} PC in C. fusca induziert, stimmt gut mit der Beobachtung von Nagano et al. (1984) überein, daß Cu-Ionen mit dem Ca^{2+} -bindenden Material co-eluierten, wenn Algen mit beiden Metallen gleichzeitig belastet worden waren.

Somit war nachgewiesen, daß alle eukaryontischen Pflanzen Schwermetalle, die in die Zellen aufgenommen werden, durch die Synthese von PC-Komplexen entgiften. Angefangen von dem fakultativ saprophytischen Organismus Euglena gracilis durch die ganze Abteilung der Phycophyta und die anderen Abteilungen des Pflanzenreiches - Sporophyta, Gymnospermae, Dicotyledonae und Monocotyledonae - bis hinauf zu der sehr fortgeschrittenen Ordnung Poales sind alle untersuchten Organismen zur PC-Synthese befähigt. (Euglenophyten enthalten als Speicherpolyglucosid Paramylum, das dem tierischen Amylum ähnlicher ist als der pflanzlichen Stärke. Poales sind als weit fortentwickelte Pflanzen ausgezeichnet durch eine erstaunliche Umweltunabhängigkeit, die ein Vorkommen der Gräser in allen Biotopen ermöglicht, einige Vertreter haben eine große Bedeutung für die menschliche Ernährung.)

IV.3. Kommt neben der PC-Synthese nicht doch auch ein MT-ähnliches Protein in Pflanzen vor?

Der Schwermetall-komplexierende Mechanismus der Pflanzen, die PC-Synthese, unterscheidet sich grundlegend von dem der Tiere, der MT-Synthese dadurch, daß Phytochelatine enzymatisch synthetisierte Peptide mit γ -Glutamylobindungen sind, Metallothioneine aber an Ribosomen synthetisierte Proteine. Beide Mechanismen sind funktionell analog: die Rolle des MT in Detoxifikation und Homöostase von Schwermetallen bei Tieren (O'Brady 1982, Webb und Cain 1982) findet ihre Entsprechung in gleichen Funktionen des PC-Systems bei Pflanzen (Grill et al. 1987). Wenn, wie vermutet, nur der jeweils eine oder andere Mechanismus verwirklicht ist, stellt sich die Frage, zwischen welchen Organismen sich in der Evolution die Spaltung zwischen diesen beiden Mechanismen vollzogen hat. Wenn man die MT-Synthese als charakteristisch für das Tierreich und die PC-Synthese als charakteristisch für das Pflanzenreich betrachtet, so könnte man diese Merkmale als zusätzliche Charakteristika für die Einordnung eines Orga-

nismus zum einen oder anderen Reich heranziehen. In diesem Zusammenhang sind die Berichte über Schwermetall-bindende Proteine bei den Pilzen interessant. Da Gene für MT-Proteine aus Saccharomyces cerevisiae (Butt et al., 1984) und die Sequenz des MT aus Neurospora (Lerch, 1984) sowie Agaricus bisporus (Lerch und Beltramini, 1986) bekannt sind, besteht kein Zweifel an deren Fähigkeit zur Metallothionein-Synthese. Andererseits berichteten Kondo et al. (1985), daß die Spaltheife Schizosaccharomyces pombe Cd^{2+} mit zwei induzierbaren Peptiden entgiftet. Nach mehreren Revisionen (Murasugi et al., 1981, Kondo et al., 1983) veröffentlichten Kondo et al. (1985) die Struktur zweier Peptide (die sie Cadystin A und B nannten), die mit PC2 und PC3 identisch sind. Grill et al. (1986 a) gelang es nachzuweisen, daß die Spaltheife S. pombe nicht nur die beiden Peptide PC2 (Cadystin B) und PC3 (Cadystin A), sondern den ganzen Satz homologer PC-Peptide mit $n = 2 - 7$, wie in der höheren Pflanze auch, synthetisiert. Dieser Befund ist insbesondere deswegen interessant, weil S. pombe mit seinem für Eukaryonten vergleichsweise kleinen Genom von 18 mbp für molekularbiologische Untersuchungen der PC-Synthese ein verglichen mit höheren Pflanzen (mit Genomen von minimal 80 mbp) experimentell leichter beherrschbares Objekt darstellt.

Die PC-synthetisierende Spaltheife S. pombe unterscheidet sich von Bäckerhefe, die eindeutig z. B. Kupfer über den Säugetier-MTs ähnliche Proteine komplexiert, durch einige Charakteristika, zum Beispiel den Besitz von Coenzym Q 10 anstelle von Coenzym Q 5 - 7. Auch im Zellteilungszyklus, in der Genregulation und in der Intronprocessierung, sowie in evolutionär konservierten Proteinen finden sich deutliche Unterschiede (Russell und Nurse 1986). Diese Eigenschaften lassen die Schizosaccharomyceten und ihre nahen Verwandten als eine besondere Gruppe innerhalb der Pilze erscheinen. Eigene Experimente lassen eine Korrelation dieser Sonderstellung mit dem Mechanismus der Schwermetall-Komplexierung erkennen: Alle 5 untersuchten Angehörigen der Schizosac-

charomycetoideae (S. japonicus, S. malidevorans, S. octosporus, S. versatilis und S. pombe) synthetisieren PC. Im Gegensatz dazu wurde in allen untersuchten Angehörigen der Saccharomycetoideae kein PC gefunden. So wurden Arten von Citeromyces, Debaromyces, Hansenula, Pichia, Wingea, Zygosaccharomyces und Saccharomyces untersucht. Auch ein Vertreter der Nadsonioideae, Wickerhamia fluorescens, und ein Vertreter der Lipomycetoideae, Lipomyces tetrasporus, synthetisierten kein PC. Neben diesen eigentlichen Hefepilzen - sämtlich Ascomyceten - wurden auch Vertreter von Hefe-ähnlichen Basidiomyceten untersucht. Während Tremellea mesenterica (Tremellaceae) kein PC synthetisierte, wurde in einer nicht näher bestimmten Art von Rhodosporidium (Teliomycetaceae) PC-Synthese festgestellt und die Peptide durch "fingerprint"-Analyse sequenziert. Rhodosporidium ist eine Gattung knospendender Hefepilze, deren Arten durch massive Anhäufung von Carotinoiden rot gefärbt sind. Des Weiteren wurde PC-Synthese auch in Sporobolomyces holsaticus und S. roseus, Angehörigen der Deuteromycotina (nicht zu verwechseln mit Fungi imperfecti!), zwei Heterobasidiomyceten gefunden. Die Fähigkeit zur PC-Synthese ist bei den Pilzen also nicht auf die auch nach anderen Eigenschaften gesondert einzuordnenden Schizosaccharomyceten beschränkt, sondern kommt ebenfalls in relativ entfernt verwandten Pilzen vor.

Wie komplexieren prokaryontische Mikroorganismen Schwermetalle? Die Frage ist trotz einiger diesbezüglicher Untersuchungen berechtigt, denn die Proteinnatur von bakteriellen Schwermetall-bindenden Liganden konnte bisher nicht überzeugender dargelegt werden als für die Komplexe aus höheren Pflanzen.

Der erste Bericht über ein bakterielles Cd-bindendes Protein (aus E. coli) vom $M_r = 39000$ Da stammt von Khazaelis und Mitra (1981), Higham et al. (1983, 1984, 1986) wiesen "neuartige Cd-bindende Proteine" genannt "Pseudothioneine" in Pseudomonas putida nach. Diese Proteine zeichnen sich durch einen hohen Cysteingehalt und Molekulargewichte von 3500 bis

7000 Da aus und binden 4 - 7 gAtome Cu, Zn und Cd pro mol Ligand. Diese Eigenschaften könnten auch, wie bei Komplexen aus höheren Pflanzen, an verunreinigten PC-Präparationen festgestellt werden.

Olafson (1986) isolierte und charakterisierte ein "Cyanobakterielles Metallothionein", Komplexe heterogener Zusammensetzung aus Synechococcus. Die Komplexe wurden durch Markierung mit ^{109}Cd lokalisiert. Protein-SH-Gruppen wurden durch Polarographie quantifiziert. Das nach Belastung mit Cd oder Cu induzierte Material wurde mittels Gelchromatographie gereinigt (das würde eventuell vorhandene PC-Komplexe nicht genügend von kontaminierenden Proteinen reinigen) und wies ein M_r von 10 kDa auf. Das "gereinigte" Material wurde über C_3 -Reversed-Phase HPLC bei pH = 7 aufgetrennt. Das Radioaktivitätsprofil der Elution zeigte 5 Hauptkomponenten, beim angewandten pH also intakte Komplexe. Betrachtet man diese Veröffentlichungen so kritisch wie die über pflanzliche Schwermetall-bindende "Proteine", so gelang es Olafson und Mitarbeitern trotz jahrelanger Bemühungen (Olafson et al. 1979, 1980, Olafson, 1984, 1986) nicht, überzeugende Beweise für die Struktur und Proteinnatur des "prokaryontischen Metallothioneins" vorzulegen. Diese Komplexe hatten nämlich eine sehr heterogene Aminosäure-Zusammensetzung und enthielten auch aromatische Reste, die in MT-Proteinen nie beobachtet wurden (Kägi und Nordberg 1979, Kägi und Kojima 1986). Eine Sequenz der ersten 40 Aminosäurereste des "prokaryontischen Metallothioneins" von Aminoterminal her wurde angegeben und mit Sequenzen von MT aus Neurospora crassa, Mensch und Scylla serrata verglichen, es wurde keine Homologie festgestellt. Lediglich das Vorkommen von 2 Cys-X-Cys-Clustern ist MT-ähnlich.

Nach Induktion durch Cd^{2+} bzw. Cu^{2+} trat eine "lag"-Phase im Wachstum und in der MT-Synthese auf, die Synthese von polarographisch meßbarem MT wurde durch Zugabe von Actinomycin D und Chloramphenicol gehemmt. (Das weist auf eine Beteiligung der Proteinsynthese an der SM-Komplexierung hin).

Zellen, die erhöhten Konzentrationen von Cd^{2+} ausgesetzt worden waren und dann über 3 Passagen in Kontrollmedium gezüchtet wurden, wuchsen bei erneuter Belastung mit Cd^{2+} ohne "lag"phase an, ein Hinweis auf genetische Fixierung des Toleranzmechanismus.

In eigenen Experimenten wurde ein Satz von SH-positiven Peptiden mit HPLC-Retentionszeiten identisch mit denen von PC aus höheren Pflanzen nach Belastung mit Cd^{2+} in Synechococcus IP 6234 synthetisiert. Dieses Phänomen kann bis jetzt nur im Analogieschluß zu den höheren Pflanzen mit der Synthese von PC-Peptiden erklärt werden. Versuche, dieses Material zu präparieren, scheiterten. In der Gelchromatographie von Rohextrakten aus Cd^{2+} -belasteten Synechococcus-Zellen analog zum Nachweis des Cd^{2+} -bindenden Materials aus C. fusca wurde in keiner der eluierten Fraktionen auch nur eines der in der Auftragslösung nachweisbaren Peptide festgestellt, das Cadmium eluierte in niedermolekularen Substanzen (unter 1 kDa) entsprechenden Fraktionen. Auch nach Ammoniumsulfatfällung der Proteine war der Satz von Peptiden nicht mehr feststellbar. Der PC-Komplex aus Synechococcus, wenn es einen solchen überhaupt gibt, unterscheidet sich in seiner Stabilität während der Aufarbeitung signifikant von PC-Komplexen aus höheren Pflanzen und eukaryontischen Algen und ist deshalb nicht mit "konventionellen" Methoden zu präparieren.

In allen anderen untersuchten Eubakterien und einem Halobakterium wurden nach Belastung mit Cd^{2+} keine PC-Peptide induziert. Für Bakterien (wie für Pilze) wurden komplexe Medien verwendet, bei denen eine Wechselwirkung des Cd^{2+} mit Mediumkomponenten nicht ausgeschlossen werden kann. Es könnte sein, daß deswegen eine mögliche PC-Synthese nicht beobachtet wurde. Bei Wachstum von S. pombe auf Minimal- und komplexen Medien wurde eine stark unterschiedliche Toxizität des zugegebenen Cd^{2+} und eine geringere PC-Synthese auf Minimalmedium festgestellt (Grill 1987).

Das Vorhandensein von MT oder MT-ähnlichen Proteinen oder eventuell nicht exprimierter, "schlafender" Gene hierfür wurde in den untersuchten Pflanzen nicht explizit ausgeschlossen. In den Beispielen, in denen die Komplexierung des Cd^{2+} mit Gelchromatographie untersucht wurde (Gerste, Wasserhyazinthe, schwimmender Hahnenfuß, Kichererbse, Mungobohne, Sojabohne, Salat, Tabak, Tomate, Wasserfarne, Chlorella fusca), war jedoch der Hauptteil (50 - 90 %) des Cd^{2+} im PC-Komplex gebunden. In Gelchromatographie-Experimenten mit Extrakten aus Cd^{2+} -belasteten Organismen, bei denen kein Zweifel an der Synthese von MT-Proteinen besteht (N. crassa, S. cerevisiae, A. salina) wurde kein Cd^{2+} in Bereichen gefunden, in denen PC eluiert worden wäre. Die überwiegende Bindung des Schwermetalls an entweder MT oder PC läßt keinen Raum für eine **gleichzeitige** wesentliche Bedeutung der beiden SM-Komplexierungsmechanismen. Die evolutionäre Grenze zwischen diesen beiden Mechanismen scheint sich in der Klasse Mycophyta, bei den Pilzen zu befinden. Schizosaccharomyceten, aber auch andere, niedrig organisierte Asco- und Basidiomyceten gehören aufgrund ihres PC-Entgiftungsmechanismus wohl eher zum Pflanzenreich, während höher entwickelte Pilze wie z. B. Angehörige der Gattungen Morchella und Agaricus, aber auch Neurospora und Saccharomyces eher dem Tierreich zuzurechnen sind. In Abbildung 63 sind die bisher dargestellten Daten in einen Stammbaum des Pflanzenreiches eingetragen. Die Schwermetallkomplexierungsmechanismen MT- und PC-Synthese entwickelten sich vermutlich unabhängig voneinander und parallel.

IV.4. Ist PC neben der primären Komplexierung auch für die Schwermetalltoleranz von Pflanzen verantwortlich?

Schwermetalltoleranz ist keine Spezialität nur weniger Pflanzen, sondern durch Selektion auch künstlich in bisher allen untersuchten Pflanzen zu erzeugen. Auch in der Natur wurde diese "Selektion" beobachtet: "Es ist erwiesen, daß

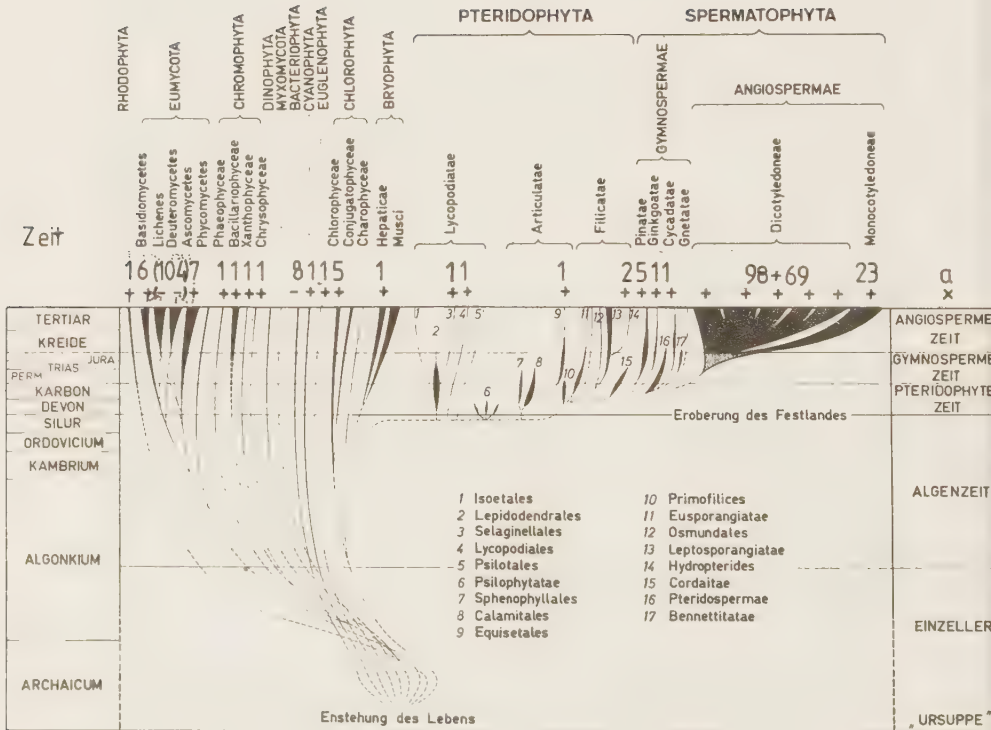


Abbildung 63

Stammbaum des Pflanzenreichs und Phylogenese des PC-Systems. Stammbaum entnommen aus Czihak et al. (1984), ergänzt durch Daten aus der vorliegenden Arbeit: a = Anzahl der jeweils untersuchten Spezies; x: PC gefunden (+) oder nicht gefunden (-).

Schwermetalltoleranz unabhängig im ganzen Spektrum der Familien des Pflanzenreiches entstanden ist, ohne daß phylogenetische Zusammenhänge erkennbar wären" (Baker, 1987). Eine genetische Basis für den Schwermetall-Toleranzmechanismus in Mimulus guttatus (Gauklerblume) wurde gefordert (Macnair, 1981). In dieser Pflanze wurde nachgewiesen, daß die Schwermetalltoleranz von einem einzigen Gen codiert wird (Macnair, 1983). Ein MT-ähnlicher Komplex, dessen Menge von der Belastungsdauer und SM-Konzentration abhängig ist, ist für die Cu^{2+} -Resistenz in Tomaten-Zellsuspensionskulturen verantwortlich (Robinson und Thurmann 1986). Es muß sich dabei, wie wir nun wissen, um PC-Komplexe handeln. Steffens et al. (1986) untersuchten Cd-resistente und sensitive Zelllinien von Tomaten-Suspensionskulturen und stellten fest, daß die Zugabe von Buthionin-Sulfoximin zur Hemmung der Glutathionbiosynthese die Cd-resistenten Zellen sensitiv gegenüber Cd machte (auf den Zusammenhang zwischen PC- und GSH-Synthese wird später eingegangen). Das Cd-bindende Material wurde als PC identifiziert, die Menge dieser Peptide wurde mit dem Grad der Resistenz korreliert. Stechapfel-Suspensionskulturzellen, die auf Cd^{2+} -Resistenz selektioniert waren, behielten die Resistenzeigenschaft über 700 Generationen (Jackson et al. 1987).

In diesen Arbeiten wurde die Synthese von PC-Peptiden und deren Beteiligung am Resistenzmechanismus bestätigt. Die ausschließliche Bindung von Cd^{2+} und Pb^{2+} an PC in R. serpentina bzw. hPC in G. max, also in Zellkulturen unterschiedlicher Schwermetalltoleranz (siehe Abbildung 11) und entsprechender, unterschiedlicher PC-/hPC-Synthesefähigkeit belegt den Zusammenhang zwischen Schwermetalltoleranz und PC-/hPC-Synthese an einem weiteren Beispiel. Nicht nur bei kurzer Belastungsdauer während der logarithmischen Wachstumsphase von Zellkulturen, sondern auch bei längerer Belastung differenzierter Pflanzen (Beispiel: Tabak, Abbildung 6) und am natürlichen Standort (siehe Beispiele in Abbildung 5) ist PC für die Komplexierung von Schwermetallen in Pflanzen

verantwortlich. Die PC-Synthesekapazität ist demnach eine für Schwermetalltoleranz von Pflanzen ausschlaggebende Eigenschaft.

Die Toleranz gegen Zink von Silene cucubalus (Mathys, 1977) und die Akkumulation von Nickel durch Arten von Alyssum und Hybanthus (Kelly et al., 1975) wurde mit der Festlegung der Schwermetalle in den Vakuolen in Form von Komplexen mit Oxalat und Malat erklärt. Deswegen untersuchte Grill (1987) die Verteilung von Cd und PC in belasteten R. serpentina Zellkulturen. Die Protoplasten enthielten fast die gesamte in intakten Zellen gefundene Menge Cd und PC, während in den daraus isolierten Vakuolenpräparationen nur 1% des Cd gefunden wurde. Das PC-System mußte deshalb in der Cytoplasmafraktion einschließlich Organellen lokalisiert sein. An der Akkumulation von Schwermetallen in Vakuolen von Silene cucubalus und z. B. Hybanthus floribundus ist PC demnach vermutlich nicht beteiligt.

Auch der Zellwand wurde eine Funktion in Akkumulation von Blei und Toleranz gegen Blei und Zink zugeschrieben. Poulter et al. (1985) untersuchten Zellkulturen eines gegen Zink und Blei toleranten und eines gegen diese Schwermetalle sensitiven Stammes von Anthoxanthum odoratum (Ruchgras) und fanden, daß im Gegensatz zu den intakten Zellen die Protoplasten beider Stämme gleich sensitiv waren. An Wurzelspitzen des toleranten und des sensitiven Stammes von Anthoxanthum odoratum bestätigten Qureshi et al. (1986) dieses Ergebnis. Nach Belastung mit $30\mu\text{M Pb}^{2+}$ ließ sich das Blei in den Zellwänden und im Cytosol der sensitiven Zellen nachweisen (durch Transmissionselektronenmikroskopie), während die Zellwände der toleranten Zellen das Blei akkumulierten und vom Cytosol zurückhielten. Der Toleranzmechanismus wurde deshalb als Eigenschaft der Zellwand angesehen. Das ist kein Einzelfall: Auch in der Alge Stigeoclonium tenue, dem Moos Rhytidiadelphus squarrosus, Zellkulturen von Populus maximowiczii sowie in Zea mays und Potamogeton pectinatus wurde dieses Phänomen beobachtet (Qureshi et al., 1986). PC ist

nach den bisherigen Erkenntnissen auch an diesem Toleranzmechanismus nicht beteiligt, sondern "nur" für SM-Komplexierung im Cytoplasma verantwortlich.

IV.5. Ist PC an der Schwermetall-Aufnahme beteiligt, und wo im Cytoplasma wird PC-gebundenes Schwermetall deponiert?

Zunächst war ein Zusammenhang der Komplexierung in PC mit der Aufnahme von Blei durch Endocytose vermutet worden. Neuere Arbeiten über Aufnahme kationischen Ferritins durch "coated vesicles" (Clathrinvesikel) in Protoplasten von Bohnen (Joachim und Robinson, 1984) und Sojabohnen (Tanchak et al., 1984) wiesen erstmals Endocytose in pflanzlichen Systemen nach. Während kationisches Ferritin, ein polyvalenter Modell-Ligand von 13 nm Ø nicht durch die Zellwandporen mit 4 nm Ø dringen kann, gelang Hübner et al. (1985) der Nachweis von Endocytose an Maiswurzelspitzenzellen (mit Zellwand, das bedeutet Einstülpung der Membran gegen den Zellturgor!) nach Belastung mit $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ und $\text{La}(\text{NO}_3)_3$. Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, daß elektronendichte Präzipitate in Membranausstülpungen der Plasmamembran ("coated pits") und in Vesikeln (mit und ohne Clathrin-Mantel) internalisiert und transportiert und schließlich auch in der Vakuole gefunden wurden. Außerdem wurde ein erheblicher Anteil des elektronendichten Materials an der Außenseite des Plasmalemmas festgelegt (Hübner et al. 1985).

Dem gegenüber stehen die Beobachtungen, daß Pb^{2+} in Suspensionskulturen von R. serpentina (Grill et al. 1987a) und Glycine max (diese Arbeit) PC induziert und in diesem komplexiert wird. Ein Zusammenhang der beiden Mechanismen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden. Es waren in der Suspensionskultur von R. serpentina keine Clathrinvesikel vorhanden, wie aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen reiner Vesikelpräparationen aus dieser Kultur hervorgeht (Abbildung 30). Die einheitlichen Vesikelpräparationen - vermutlich dictyosomaler Vesikel - enthielten nur in frühen Stadien der Reinigung Blei und PC, das elektronen-

mikroskopisch bis in molekulare Dimensionen herab lokalisiert werden konnte. Der Hauptteil des Pb^{2+} -PC-Komplexes befand sich im Cytoplasma. Eventuell könnte in den Vesikeln vorhandenes Blei während der Dauer der Isolierungsprozedur (2 Tage) ausgeschleust worden sein, es gibt aber keine bekannte Möglichkeit, einen solchen Prozess sicher zu unterbinden.

Die Vermutung, Zellorganellen - die bei der Vesikelisolation nicht intakt bleiben konnten - könnten PC enthalten, konnte dagegen untersucht werden. Es gelang - nach meinem Wissen zum ersten Mal - reine Präparationen intakter Plastiden aus Suspensionskulturzellen, allerdings nur von Dioscorea composita und nicht von R. serpentina zu isolieren. Auch Mitochondrien und Peroxisomen aus dieser Kultur konnten analysiert werden, elektronenmikroskopische Untersuchungen (Abbildungen 35 und 37) belegten die Reinheit der Präparationen und intakte Organellstrukturen. Die Organellen enthielten kein PC, aber signifikante Mengen Blei. Es wurde genügend Protein in diesen Präparationen erhalten, daß auch bei auf Protein bezogen 10-fach geringerer PC-Menge dieses nicht hätte übersehen werden können. Die in den Organell-Rohpräparationen festgestellten Gehalte an PC sind vermutlich durch in diese Fraktionen mitgeschleppte Reste des Cytosol-Überstandes verursacht. Das Blei war nicht nur in PC-gebundener Form im Cytosol, sondern auch in partikulärer Form unter anderem an Membranstrukturen vorhanden. Vermutlich stellt dies aber keine spezifische Bindungsform, sondern wegen ihrer Unlöslichkeit unschädliche unspezifische Bleipräzipitate dar. PC-Komplexe wurden nur im Cytosol gefunden, in Dioscorea composita ist PC demnach aus den Zellorganellen ausgeschlossen, was erneut die Schutzfunktion des PC-Systems belegt.

IV.6. Ist die Bindung von Cadmium in PC in pflanzlicher Nahrung für dessen Aufnahme relevant?

Den Hauptteil des Cd^{2+} , das der Mensch aufnimmt, führt er sich mit pflanzlicher Nahrung zu (deHaan, 1975). Für Schwermetalle, die von für die Ernährung des Menschen besonders bedeutenden Angehörigen der Poaceae, z. B. in Weizen oder Gerste aufgenommen und in den Aleuronschichten der Samen festgelegt werden (Kjellström 1975), ist PC die relevante Bindungsform. Dasselbe gilt z. B. für Sojabohnen (Fabales), in denen Cd^{2+} in den Samen festgelegt wird (Cataldo et al. 1978). Einige Angehörige der Fabales sind sehr wichtige Nahrungspflanzen. Sojabohnen sind vor allem im Asiatischen Raum ein Grundnahrungsmittel, Erbsen sind die ältesten bekannten Kulturpflanzen überhaupt.

Wie bei Algen-Protein birgt also auch der Genuß vermeintlich besonders wertvoller Vollkornnahrung potentielle Gefahren in sich. Cadmium stellt wegen der von diesem Schwermetall verursachten, chronischen, unterschwelligen Vergiftungserrscheinungen in industrialisierten Ländern eine Gefahr für die Gesundheit dar (Friberg et al. 1974). Eine akute Cd-Vergiftung und dadurch induzierte Synthese von MT in großen Mengen ist Ursache für die Itai-Itai (Aua-ua) Krankheit in Japan (Tsuchya 1978). Die Synthese von MT wird bei Überschreiten einer Grenze von 30 ppm Cd induziert (Bremner et al. 1973). Irreversible Schäden treten ab ca. $200\mu\text{g Cd/g (FG)}$ in den Nieren, dem neben der Leber am schwersten betroffenen Organ auf (Webb und Cain 1982).

Wie sollte aber der Verbleib verabreichter PC-Komplexe im Versuchstierorganismus verfolgt werden? Nur eine radioaktive Markierung der PC-Komplexe kam hierfür in Frage. Wagner (1984) konnte den Cd^{2+} -Komplex aus Tomaten durch einfachen Isotopenaustausch von ^{112}Cd gegen ^{109}Cd markieren. Wenn der von Wagner untersuchte Komplex tatsächlich wie vermutet PC war, mußte sich reiner Cd^{2+} -PC-Komplex auf die gleiche Weise markieren lassen. Die Markierung von isolierten PC-Komplexen

gelang durch Austausch des komplexierten ^{112}Cd gegen ins Medium zugegebenes ^{109}Cd . Das belegt, daß der Komplex **kinetisch** instabil ist - der Austausch war nach 15 min. vollständig. Gleichzeitig wird aber kein freies Cd^{2+} im Medium mit gelöstem PC-Komplex gefunden, was die große **thermodynamische** Stabilität des Komplexes belegt. Zur Markierung mit ^{109}Cd war der 1500ste Teil der Molmenge des im "gesättigten" PC-Komplex gebundenen Cd^{2+} eingesetzt und völlig gebunden worden.

Mit dem markierten PC-Komplex wurde eine geringfügig erhöhte Resorption und damit verbundene kürzere biologische Halbwertszeit, verglichen mit freiem Cd^{2+} , festgestellt. Im sauren pH des Magens werden PC-Komplexe dissoziiert, die Verdünnung mit dem Mageninhalt bewirkt, daß die Komplexe im alkalischen Milieu des Darms nicht wieder reassoziieren können. Deshalb wird Cd^{2+} , das in PC komplexiert verabreicht wird, wie freies Cd^{2+} resorbiert. Einmal aufgenommenes Cd^{2+} wird nur langsam wieder ausgeschieden. Die Aufnahme von Cd überwiegt in vielen Industrieländern bei einem erheblichen Teil der Bevölkerung die Ausscheidung (Friberg et al. 1974). Die chemische Bindungsform von Schwermetallen in Pflanzen, wie nun feststeht: in PC-Komplexen, ist für die beobachtete gastrointestinale Absorption, den Gewebsgehalt und die Retention in aufnehmenden Tieren relevant (Grünhage et al. 1985).

Bei akuten Vergiftungen durch Schwermetalle wird mit Berlinerblau oder ähnlichen Chelatoren eine Ausscheidung erreicht (Dr.D.Berg, persönliche Mitteilung), für chronische Belastungen kommt diese Methode aber wegen der gleichzeitigen Komplexierung physiologisch wichtiger Ionen wie Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} und Fe^{2+} nicht in Frage. Eine spezifisch nur für Übergangsmetalle wirksame Dekorporation wäre wichtig. Dazu müßte ein spezifischer Chelator (PC?) geringe, im Gleichgewicht mit MT-gebundenen Ionen frei vorliegende Konzentrationen von Schwermetallen abfangen. Es wurde berichtet, daß MT-gebundenes Cd von der Leber abgegeben und von der Niere wieder

aufgenommen wird (Piscator 1964). Intravenös appliziertes Cd-MT kann in die Niere aufgenommen werden und diese schädigen (Nordberg et al., 1975). MT-Komplexe sind also mobil, und es bestand Hoffnung, PC als Ligand könnte aus diesen Schwermetalle dekorporieren.

Dieser Vermutung wurde in einem Experiment nachgegangen. PC wurde als metallfreier Ligand und als Zn^{2+} -Komplex, in vor Oxidation geschützter, aber nur mit geringer Affinität komplexierter Form, eingesetzt. Zum Vergleich diente GSH als monovalentes Mercaptan und SH-freie physiologische Kochsalzlösung. SH-Gruppen wurde in großem Überschuß gegenüber der Molmenge des inkorporierten Cd^{2+} eingesetzt. Mit allen 4 Zugaben wurde keine beschleunigte Dekorporation des (nach artifizieller chronischer Belastung in Versuchstieren vorhandenen) Cd^{2+} festgestellt.

Die Unwirksamkeit der intraperitoneal verabreichten Substanzen kann viele verschiedene Ursachen haben: neben veränderter Aufnahme durch mehrere Zellschranken (Intraperitonealraum / Blutbahn, Blutbahn / Leber bzw. Nierenzelle) kommt auch eine Oxidation der ungeschützten Peptide in der Blutbahn in Frage. Auch konnten die Liganden mit anderen, zum Beispiel in der Blutbahn vorhandenen Schwermetallen (Cu^{2+} im Coeruloplasmin, Fe^{2+} im Transferrin) abgesättigt werden, bevor sie mit dem Cd^{2+} , z. B. im MT in den Nieren, in Kontakt kamen. Dekorporationsversuche zum Beispiel durch einmalige Injektion einer PC-Dosis direkt in die Blutbahn (wiederholte intravenöse Injektionen sind bei Ratten unmöglich) wären eine sinnvolle Fortsetzung dieser Experimente gewesen, um schrittweise dem Grund für die Unwirksamkeit oder den Bedingungen für eine wirkungsvolle Dekorporation auf die Spur zu kommen. Mit Rücksicht auf den Tierschutz (neue Tierschutzbestimmungen verzögerten die Genehmigung weiterer Versuche über das Ende dieser Arbeit hinaus) und wegen der aufwendigen Isolation von Grammengen PC-Komplex (40 mg/Liter Suspensionskultur von R. serpentina) müssen weitere Versuche zur Dekorporation von Cd^{2+} aus Ratten späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

IV.7. Wie wird PC synthetisiert?

Die repetitiven γ -Glutamylbindungen in den PC-Peptiden sind das wesentlichste Unterscheidungsmerkmal zwischen MT-Proteinen und PC-Peptiden und schließen eine ribosomale Synthese der Phytochelatine aus (Grill et al. 1985 a, 1986 a, 1987). Der zeitliche Verlauf der Synthese der einzelnen PC-Peptide und des Verbrauchs von GSH belegt die Rolle von GSH als Substrat der PC-Synthese (Grill et al. 1986 a, 1987).

Bei der Untersuchung der PC-Synthese von Angehörigen der Fabales wurde festgestellt, daß die Pflanzen, die anstelle von GSH Homoglutathion enthalten, nicht PC, sondern Homo-Phytochelatine synthetisieren. Etliche der untersuchten Pflanzen enthielten ein Gemisch aus GSH und hGSH, diese Pflanzen synthetisierten ein Gemisch aus PC und hPC. Die carboxyterminale Aminosäure des PC wird also von der carboxyterminalen Aminosäure des GSH bestimmt, möglicherweise liefert intaktes GSH die drei carboxyterminalen Aminosäuren des PC. PC könnte auch von den Glutathionbiosyntheseenzymen entsprechenden Enzymen aus den einzelnen Aminosäuren synthetisiert werden. Gegen die Möglichkeit, daß die Glutathion-synthetase unter Schwermetallbelastung ihre Spezifität ändert und Glu-Cys-Reste nicht auf Gly, sondern auf GSH überträgt, spricht die in tierischen Organismen (und mit gereinigter GS II in vitro) ausgeschlossene PC-Synthese.

Bei spezifischer Hemmung der Glutathionbiosynthese mit BSO unterbleibt die PC-Synthese nach Schwermetallbelastung (Grill et al. 1987). Das Wachstum belasteter Zellen wird mit Hemmung durch BSO alleine nicht gehemmt. Entweder ist die Substratbindungsstelle des PC-synthetisierenden Enzyms mit der Bindungsstelle von GS I für Glu identisch (das ist sehr unwahrscheinlich), oder dieser Befund beweist den Aufbau von PC aus vorgefertigten Glu-Cys-Einheiten. Reese und Wagner (1987 b) stellten in entsprechender Weise fest, daß in Tabak-Suspensionkulturzellen BSO allein das Wachstum nicht hemmte, daß aber die Synthese von PC und, bei gleichzeitiger

Gabe von Cd und BSO, auch das Wachstum der Zellen gehemmt war.

Dies steht im Gegensatz zu den Befunden von Rennenberg und Uthemann (1980), die das Wachstum von nicht mit Schwermetallen belasteten photoheterotroph wachsenden Tabaksuspensionskulturzellen mit Methioninsulfoximin in geringen Konzentrationen (10^{-5} M) hemmten. Der Grund für diese Diskrepanz kann in der Hemmung auch der Glutaminsynthetase durch Methioninsulfoximin oder im Bedarf an GSH zum Schutz vor Oxidation durch hochreaktive Sauerstoffradikale in funktionellen Chloroplasten liegen.

Hemmt nun BSO vielleicht auch die PC-Synthese, unabhängig von der GSH-Biosynthese? Diese Möglichkeit konnte ausgeschlossen werden: Zugabe von GSH zu Suspensionskulturen von R. serpentina hebt die Hemmung der PC-Synthese nach Zugabe von BSO wieder auf (Tabelle 22). Dieser Befund wurde von Scheller et al. (1987) an Tomatensuspensionskulturen bestätigt. BSO wurde eingesetzt, um die Synthese von PC in Tomaten-Suspensionskulturzellen zu hemmen. Hinzufügen von GSH konnte die Synthese von PC wieder ermöglichen. Die in der vorliegenden Arbeit an R. serpentina gewonnenen Daten wurden also an einem anderen Organismus bestätigt. Außerdem wurde nachgewiesen, daß die Zugabe von Cycloheximid die Synthese von PC nicht hemmt, also Proteinsynthese nicht direkt an der PC-Synthese beteiligt ist (Scheller et al. 1987). Auch mit Zugabe von hGSH zu Suspensionskulturen von R. serpentina und G. max wurde eine geringe PC- bzw. hPC- Synthese beobachtet (Tabellen 23 - 25). GSH hemmte das Wachstum von Suspensionskulturen von G. max deutlich, dennoch war eine geringe Synthese von hPC trotz Hemmung der GS I mit BSO möglich. (Die Hemmung des Wachstums von Sojabohnen-Calluskulturen durch GSH wurde schon früher beobachtet (Bergmann und Rennenberg (1975))).

In den jeweiligen heterologen Fütterungen (von hGSH an GSH-Zellen und umgekehrt) wurde eine Abspaltung der "falschen"

carboxyterminalen Aminosäure und ein Austausch gegen die "richtige" Aminosäure mit anschließender Synthese der entsprechenden PC-Peptide beobachtet. PC wird also nicht aus den einzelnen Aminosäuren, sondern aus GSH als Substrat aufgebaut.

Der Austausch der carboxyterminalen Aminosäure des GSH in Pflanzen ist durchaus plausibel. Der Abbau von GSH findet in tierischen Organismen mit den Enzymen des γ -Glutamylcyclus statt, wobei das aminoterminal Glu auf andere Aminosäuren oder H_2O übertragen und damit hydrolysiert wird, Cys-Gly bleibt zurück. Ganz anders in Pflanzen: Wie aus den Abbauprodukten von GSH-S-Konjugaten (zum Beispiel aus Herbiziden) festgestellt wurde, wird in Pflanzen das carboxyterminale Gly (und in analoger Weise sicher auch das β -Ala des hGSH) abgespalten (Lamoureux und Rusness 1981). Rennenberg (1982) schlug deshalb einen alternativen Glutamylcyclus vor, wie er in Pflanzen ablaufen soll (siehe Abbildung 64). Berichte über eine Cys-Gly -spezifische Aminopeptidase M wie in Tieren fehlen für Pflanzen, aber auch die von Rennenberg (1982) postulierte Carboxypeptidase konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Einen weiteren positiven Beweis für den Einbau von GSH in PC stellen die Ergebnisse der Fütterung von radioaktiv markiertem GSH und Glu-Cys an Suspensionskulturen von R. serpentina dar. Es wurden zwar nur wenige % der zugegebenen Radioaktivität in die Zellen aufgenommen, und davon wiederum nur ein kleinerer Teil in PC eingebaut, der Einbau von markiertem GSH in PC-Peptide ließ sich aber im zeitlichen Verlauf (Abb. 54) und durch Messung der Aktivität durch HPLC getrennter Peptide (Abb. 53) belegen. Die GS I dieser Kulturen war mit BSO gehemmt worden, wenn diese Hemmung vollständig war (was nicht bewiesen werden konnte, aber aus in vitro gewonnenen Daten angenommen werden muß), konnte PC nur aus den zugegebenen Peptiden und nicht aus den einzelnen Aminosäuren synthetisiert worden sein.

die Markierung bezogen auf SH-Gruppen konstant bleiben müssen, nahm aber nach den Daten aus entsprechenden Experimenten ab (Tab. 27). Auch am Glu und Gly doppeltmarkiertes GSH führte zu Ergebnissen, die nicht den erwarteten Verhältnissen entsprachen (Tab. 28). Das Verhältnis $\text{Glu}^*/\text{Gly}^*$ hätte von 10 im GSH auf 20 in PC2, 30 im PC3 u.s.w. zunehmen sollen, wurde aber geringer. Möglicherweise ist nicht alles intrazelluläre GSH gleichermaßen verfügbar, und die PC-Synthese nutzt nicht nur das zugegebene GSH (oder Glu-Cys). Mit Hemmung der GS I durch BSO konnte der GSH-Gehalt der Zellen nicht auf 0 gebracht werden, sondern es blieb ca. 40% des GSH-Gehaltes der Kontrolle erhalten. Lange Halbwertszeit oder Kompartimentierung des GSH (z. B. in Plastiden) können die Ursache hierfür sein. Die Daten aus den Fütterungen radioaktiv markierten GSHs und Glu-Cys belegen den Einbau dieser Peptide in PC, möglicherweise sind aber die gefütterten Peptide nicht das alleinige Substrat zur PC-Synthese. Die von Grill et al. (1985 a) postulierte Funktion des GSH in der Schwermetallkomplexierung ist aber gesichert und muß den bisher bekannten Funktionen von GSH zur Seite gestellt werden (Abbildung 65).

Abbildung 65 faßt die Funktionen von GSH in der Pflanze zusammen. GSH ist die Haupttransportform für reduzierten Schwefel, der vom Ort seiner Reduktion (Chloroplasten in den grünen Blättern) zu den Orten des Verbrauchs, zum Beispiel bis in die Wurzeln transportiert werden muß. Neben Sulfat in den Vakuolen ist GSH die Hauptspeicherform für Schwefel, wenn er im Überschuß angeboten ist, und Depotform in Samen (Rennenberg 1982). In Chloroplasten liegen besonders hohe Konzentrationen von GSH (1 - 3,5 mM) vor (Foyer und Halliwell 1976). Die mit dieser hohen Konzentration korrelierte Funktion des GSH in der Entgiftung von Peroxiden in Spinatchloroplasten, eine gekoppelte Reaktion der Ascorbatperoxidase und Glutathionreduktase, ist bewiesen (Foyer und Halliwell 1976). Diese Schutzfunktion ist in Chloroplasten unabhängig von GSH-Peroxidase, wie sie z. B. als Selenoenzym

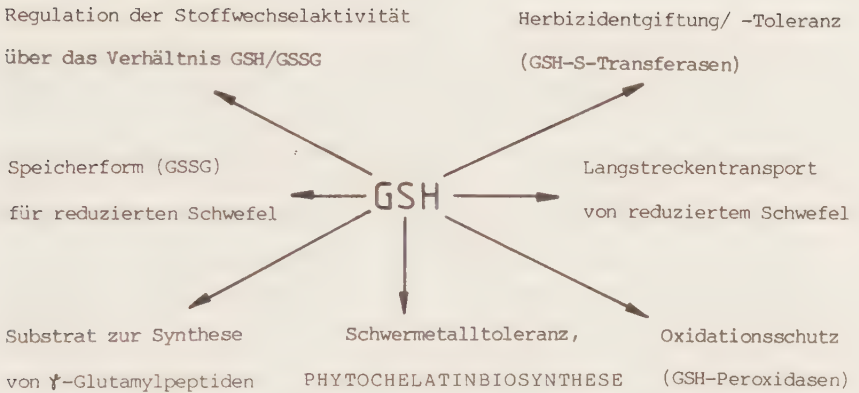


Abbildung 65

Funktionen von Glutathion (GSH) in der Pflanze. Das Tripeptid GSH ist für wichtige Primärstoffwechselfunktionen ein zentraler Metabolit.

in Erythrocyten gefunden wurde (Flohè und Günzler 1974). In Mais wurden aber nicht-selenhaltige GSH-Peroxidaseaktivitäten im Cytosol nachgewiesen (siehe Literatur zitiert in Rennenberg 1982). Die Rolle des GSH als Akzeptorsubstrat für die Entgiftung von Pestiziden und Herbiziden durch GSH-S-Transferasen ist etabliert (Lamoureux und Rusness 1981). Pflanzen mit hoher GSH-Konzentration (zum Beispiel Mais) sind resistenter gegen die Vergiftung mit Herbiziden (z.B. Thiocarbamate, Thiuramdisulfide) als solche mit geringer GSH-Konzentration, zum Beispiel viele Unkräuter (Carringer et al. 1978). Weiterhin wurde berichtet, daß das Verhältnis GSH /GSSG sehr groß sein muß, damit optimale Proteinsynthese sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Zellen abläuft (Fahey et al. 1980). In Chloroplasten und pflanzlichem Cytosol ist das GSH/GSSG-Verhältnis im Licht ebenfalls hoch, im Dunklen wird es kleiner. In stoffwechsel-inaktiven Geweben, z. B. reifen Samen, ist das GSH/GSSG-Verhältnis besonders niedrig. Daraus wurde eine regulatorische Funktion des GSH abgeleitet (Fahey et al. 1980, Rennenberg, 1982).

Diese Funktionen des GSH lassen eine ubiquitäre Verbreitung dieses Primärstoffwechselprodukts in allen lebenden Zellen vermuten (Kosower, 1976), für das Pflanzenreich ist dies aber bis jetzt nicht überzeugend dargelegt worden (Kasai und Larson, 1980). Für die Fähigkeit zur PC-Synthese im ganzen Pflanzenreich ist die ubiquitäre Verbreitung des GSH Voraussetzung. Das von Price (1957) und Carnegie (1963b) entdeckte Homoglutathion (hGSH) ist eine wesentliche Ausnahme von dieser Regel. Homoglutathion ist aber dem GSH funktionell analog (Macnicol und Bergmann 1984), wie auch durch die Äquivalenz des PC und hPC belegt wird.

Wenige weitere Ausnahmen sind bekannt. Grampositive Bakterien, zum Beispiel, enthalten, wenn überhaupt, nur geringe Mengen GSH (Fahey et al., 1978). Glu-Cys und Thiosulfat sind die Haupt-Thiole in Halobakterien (Newton und Javor, 1985).

IV.8. Was determiniert die Synthese von GSH oder hGSH?

Die Spezifität für den Einbau von Gly oder β -Ala ist zunächst in der Glutathionbiosynthese zu suchen. Das Substratangebot an Gly bzw. β -Ala kann mitbestimmend, aber nicht letztlich entscheidend für die Synthese des einen oder anderen Homologs sein. Gly muß in nennenswerten Konzentrationen für die Proteinbiosynthese auch in reinen hGSH-Pflanzen vorhanden sein. β -Ala entsteht außer durch die in einigen Bakterien nachgewiesene Decarboxylierung von Asp und die in tierischen Zellen festgestellte Freisetzung aus Carnosin (His- β -Ala) auch als Abbauprodukt des Uracils und Cytosins (Griffith 1986), muß also auch in nicht-hGSH-Pflanzen vorhanden sein. Aminosäureanalysen aus säurelöslichen Überständen von Rohextrakten von Zellkulturgewebe GSH- und hGSH-haltiger Pflanzen zeigten, daß tatsächlich β -Ala neben Gly in GSH- und hGSH-Pflanzen vorkommt. hGSH-Pflanzen wiesen keine erhöhte β -Ala-Konzentration auf, das Verhältnis von β -Ala zu Gly war in allen untersuchten Pflanzen ähnlich (zwischen 4 und 14).

Aus Robinia pseudacacia, einer Pflanze, die nur hGSH synthetisiert, konnten die Enzyme der Glutathionbiosynthese angereichert und die Spezifität untersucht werden. Die "Glutathionsynthetase" aus R. pseudacacia ist für β -Alanin spezifisch und wurde deshalb als Homogluthathionsynthetase bezeichnet (Kap. III.6). Die Enzympräparationen zeigten während der Aufarbeitung starke Aktivitätsverluste, die den Reinigungserfolg durch Abtrennung von Protein zum Teil zunichte machten. Die Enzymaktivitätsbestimmungen ergaben uneinheitliche Daten, weswegen keine Reinigungstabelle aufgestellt werden konnte. Aus R. serpentina oder anderen GSH/PC-Pflanzen konnte in den eigenen Experimenten keine Glutathionsynthetase gereinigt werden, deren Substratspezifität Aufschluß über die Determination der ausschließlichen GSH-Synthese gegeben hätte.

Die Isolation von pflanzlichen Glutathionbiosyntheseenzymen ist offensichtlich auch für andere Arbeitsgruppen schwierig gewesen. In den eigenen Versuchen, nach Webster und Varner (1954 a, 1954 b) pflanzliche Glutathionsynthetase zu reinigen, tauchten Zweifel an den Literaturvorschriften auf. Die Angabe, daß Glu-Cys aus freiem Cystein nach King und Kidd (1949) synthetisiert wurde, ist mit Sicherheit nicht korrekt. Phthaloyl-Glutaminsäureanhydrid reagiert schneller mit -SH als -NH₂; der mit Cystein gebildete Thioester hydrolysiert praktisch sofort, die beschriebene Synthese ist also unmöglich. Die Tatsache, daß die Grafen für Reaktionsgeschwindigkeit, pH-Optimum und substratabhängigen Umsatz in den beiden Veröffentlichungen über GS I und II exakt identisch sind, vermindert das Vertrauen in die Publikationen von Webster weiter.

Während die Isolation der Glutathion-Biosyntheseenzyme aus tierischen Zellen und Bäckerhefe konstant weiterentwickelt wurde (siehe Zusammenfassung in Meister 1985), vergingen nach den ersten Untersuchungen der pflanzlichen GSH-Biosynthese durch Webster und Varner (1954 a, 1954 b) 32 Jahre bis zum Erscheinen der nächsten Veröffentlichung (Law und Halli-

well 1986) über die Gluthationsynthese in höheren Pflanzen. Die Autoren zitieren die Arbeit über GS I (Webster und Varner 1954 a), übersehen aber geflissentlich die Arbeit über GS II (Webster und Varner 1954 b) und betonen, die erste Reinigung von GS II aus Spinat zu berichten. Zwischen diesen Zeilen ist zu lesen, daß auch in den Untersuchungen von Law und Halliwell (1986) die Experimente von Webster und Varner (1954 a, 1954 b) nicht reproduzierbar waren.

Law und Halliwell (1986) reinigten die pflanzliche Glutathionsynthetase in Anlehnung an die Reinigung der GS II aus Rattennieren durch Meister (1985). Eine (in den Experimenten der vorliegenden Arbeit nicht angewandte) Affinitätschromatographie an Aminoethyl-ATP-Agarose war dabei der wesentlichste Reinigungsschritt, aber für eine sehr geringe Aktivitätsausbeute (5%) verantwortlich. Mit "konventionellen" Reinigungsschritten wurde nur eine 7,3-fache Reinigung erzielt. Dieser Befund und das pH-Optimum zwischen pH 8 und pH 9 sind in guter Übereinstimmung mit den eigenen Befunden an der Homoglutathionsynthetase aus R. pseudacacia. Die Substratspezifität gegenüber β -Ala wurde von Law und Halliwell (1986) nicht untersucht.

Macnicol (1987) isolierte Glutathionsynthetasen aus Mungobohnen und Erbsen. Das Enzym aus Mungobohne war spezifisch für β -Alanin, während das Enzym aus Erbsen bevorzugt Glycin umsetzte. Das aus Mungobohnen isolierte Enzym wurde von Macnicol (1987) ebenfalls als Homoglutathionsynthetase bezeichnet, was die in Kap. III.6 dargestellten (möglicherweise gleichzeitig erarbeiteten) Ergebnisse bestätigt. Ob die Keimlinge von Cicer arietinum, die ein Gemisch aus hGSH und GSH synthetisierten, und die Suspensionskultur von Cicer arietinum, die nur GSH enthielt, verschiedene Enzyme der Glutathion-Synthetase oder ein Enzym GS II mit von R. pseudacacia-hGS unterschiedener Substratspezifität besitzen, konnte nicht untersucht werden. Es gelang trotz Variation aller maßgeblichen Parameter nicht, aus diesen Quellen die Glutathion-Synthetase zu isolieren. Das Enzym GS II aus E.

coli akzeptierte beide Aminosäuren als Substrat, bevorzugt allerdings Gly. E. coli enthält aber kein hGSH: die stationäre Konzentration von β -Ala in E. coli muß demnach so niedrig sein, daß keine meßbare Synthese von hGSH stattfindet.

In E. coli und S. pombe wurde in einigen wenigen von vielen angesetzten Versuchen festgestellt, daß dem Medium zugegebenes β -Ala tatsächlich zur Synthese einer bei der Retentionszeit von hGSH eluierenden, SH-positiven Substanz führte, die neben dem GSH nachzuweisen war. Die Aufnahme und der Einbau von β -Ala waren aber nicht reproduzierbar, so daß kein hGSH aus diesen Organismen isoliert werden konnte, um dessen Aminosäurezusammensetzung zu beweisen.

IV.9. Was begrenzt die PC-Synthesefähigkeit: vielleicht die Glutathionbiosynthese?

Wenn die Konzentration von GSH oder Glu-Cys als Substrate die PC-Synthese limitiert, muß sich eine Erhöhung der Konzentration von GSH oder Glu-Cys in einer entsprechenden Erhöhung des Gehalts an PC und der Schwermetalltoleranz auswirken. Die intrazelluläre GSH-Konzentration kann durch Erhöhung der Cysteinkonzentration erhöht werden, da diese Aminosäure zusammen mit der Aktivität der GS I die Synthese des GSH begrenzt (Heinle et al., 1976, Williamson und Meister, 1981). Die Beobachtung, daß nur 2 % von den ca. $10\mu\text{M}$ Cys in Pflanzenzellen rasch umgesetzt werden (Giovannelli et al., 1978) legt den Schluß nahe, daß die Syntheserate des GSH in Pflanzenzellen von der begrenzenden Konzentration an Cys weit unter dem KM des Enzyms bestimmt wird.

Bisher wurde nur an Säugetieren eine artifizielle Erhöhung der Cysteinkonzentration beschrieben. Oxothiazolidin-4-Carboxylat, ein Analog des 5-Oxoprolins, wird vom Enzym Oxoprolinase gespalten. Aus Oxoprolin wird in ATP-abhängiger Reaktion durch die Oxoprolinase Glutamat synthetisiert, aus

Oxothiazolidin-4-Carboxylat entsteht Cys (Williamson und Meister, 1981). Im Säugetierorgansimus ist extern zugegebenes Cys in nennenswerten Konzentrationen toxisch, deshalb hat die Gabe von Oxothiazolidin-4-Carboxylat zur Erhöhung der intrazellulären Cysteinkonzentration besondere Bedeutung. Demgegenüber werden sowohl GSH als auch Cys von Tabak-Suspensionskulturzellen aufgenommen (Rennenberg, 1982). Für Versuche zur Erhöhung der intrazellulären Cysteinkonzentration in Zusammenhang mit Schwermetallbelastung an Pflanzen ist Oxothiazolidin-4-Carboxylat ein wichtiges Substrat, weil es mangels einer freien SH-Gruppe nicht schon im Medium mit z. B. Cd^{2+} unter Komplexbildung reagiert.

In Fütterungsexperimenten mit Oxothiazolidin-4-Carboxylat, Cys und GSH ließ sich an Suspensionskulturen von R. serpentina eine Erhöhung des intrazellulären GSH-Gehaltes erreichen, für die Suspensionskultur von P. aureus wurde mit Oxothiazolidin-4-Carboxylat und Cys eine Erhöhung der hGSH-Konzentration erreicht. In beiden Kulturen wurde mit Oxothiazolidin-4-Carboxylat und Cys eine Erhöhung der GSH bzw. hGSH-Konzentration um den Faktor 5 erreicht, die PC-/hPC-Synthesefähigkeit wurde aber nicht entsprechend erhöht. In R. serpentina wurde eine Verminderung der Schwermetalltoleranz und der PC-Synthesefähigkeit beobachtet, die negativen Effekte durch die mögliche Fehlregulation des Zellstoffwechsels durch die Verschiebung des GSH/GSSG-Verhältnisses machten eventuelle positive Wirkungen der Fütterungen zunichte. Die PC-Synthese wird zumindest in Suspensionskulturen von R. serpentina nicht von der GSH-Synthese begrenzt. In Suspensionskulturen von P. aureus wurde nach Fütterung mit Oxothiazolidin-4-Carboxylat eine Erhöhung der hPC-Synthese um den Faktor 2 beobachtet, die größere Schwermetallempfindlichkeit und geringere hPC-Syntheseleistung dieser Kultur ist also möglicherweise zum Teil durch eine substratlimitierte hGSH-Biosynthese begrenzt. Gly oder β -Ala hatten in keiner der Kulturen einen Effekt auf die GSH-/hGSH- und PC-/hPC-Biosynthese, die intrazelluläre Konzentration dieser Aminosäuren begrenzte die PC-Synthese also nicht.

V. Zusammenfassung

Aufgabenstellung: Es sollte das Vorkommen der Fähigkeit zur PC-Synthese im Pflanzenreich untersucht werden. Die mögliche Rolle von Glutathion oder Glu-Cys als Substrate der PC-Synthese sollte nachgewiesen werden. Stoffwechselphysiologische Untersuchungen sollten Aufschluß über die Aufnahme und Retention von Phytochelatin-komplexiertem Cadmium geben. Die intrazelluläre Lokalisation von Phytochelatin-Komplexen sollte untersucht werden.

1. Es wurde ein rasches Verfahren zur Analyse von differenzierten Pflanzen und Suspensionskulturen auf die Fähigkeit zur Phytochelatin-Synthese erarbeitet. In allen 195 untersuchten Angehörigen aus 64 der 110 Ordnungen der Spermatophyta wurde die Fähigkeit zur Phytochelatin-Synthese nachgewiesen.

2. Die Ordnung Fabales wurde eingehend untersucht und festgestellt, daß 40 der 69 untersuchten Arten Homoglutathion oder ein Gemisch aus Homoglutathion und Glutathion enthalten. Diese Pflanzen synthetisierten Homo-Phytochelatin oder ein Gemisch aus Homophytochelatin und Phytochelatin, die carboxyterminale Aminosäure des Glutathions findet sich in den Phytochelatin-Peptiden wieder. Die Äquivalenz des Homo-Glutathions mit Glutathion und des Homo-Phytochelatins mit Phytochelatin wurde gezeigt. Ein modifiziertes Verfahren zur Präparation von Homo-Phytochelatin-Komplexen geringerer Größe und Stabilität wurde erarbeitet. Die Induktion von Homo-Phytochelatin durch Ag^+ , Au^+ , Bi^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Dy^{3+} , Er^{3+} , Eu^{3+} , Fe^{2+} , Ga^{3+} , Gd^{3+} , HASO_4^{2-} , Hg^{2+} , In^{3+} , Lu^{3+} , Mn^{2+} , Nd^{3+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Pt^{2+} , Sb^{3+} , SeO_3^{2-} , Sm^{3+} , Sn^{2+} , Yb^{3+} und Zn^{2+} wurde nachgewiesen.

3. Aus der Grünalge Chlorella fusca wurde nach Belastung mit Cd^{2+} ein schwermetallbindendes Material isoliert. Die Identität dieses Materials mit den aus Kormophyten bekannten

Phytochelatin-Komplexen wurde durch Sequenzierung der Peptide bewiesen. Die Phytochelatin-Komplexe aus Algen lassen sich ähnlich wie Phytochelatin in höheren Pflanzen durch Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ga^{3+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} und Zn^{2+} induzieren. Die Ubiquität des Phytochelatin-Systems auch in Phycophyta wurde durch den Nachweis der Fähigkeit zur Phytochelatin-Synthese in 11 Arten aus 6 Klassen gezeigt. In den Phytochelatin-Komplexen aus Algen und höheren Pflanzen wurden wechselnde Mengen freien Sulfids nachgewiesen.

4. Phytochelatin-Synthese wurde auch in 13 Pilzarten nachgewiesen; in 104 anderen Pilzarten und in tierischen Organismen, bei denen die Synthese von Metallothioneinen zur Schwermetallkomplexierung bekannt ist, wurde keine Phytochelatin-Synthese festgestellt. Eine Dichotomie der beiden Schwermetallkomplexierungsmechanismen und ihre phylogenetische Divergenz wurde diskutiert. Eubakterien und ein Halobakterium zeigten keine Phytochelatin-Synthese, in Synechococcus, einem Cyanobakterium, wurde Phytochelatin-Synthese vermutet, aber nicht eindeutig bewiesen.

5. Die intrazelluläre Verteilung von Phytochelatin und darin komplexiertem Blei wurde untersucht. Es gelang, aus Suspensionskulturen von R. serpentina einheitliche Präparationen von dictyosomalen Vesikeln zu isolieren. Pb^{2+} -Phytochelatin-Komplexe konnten in diesen Vesikeln bis in molekulare Dimensionen herab elektronenmikroskopisch lokalisiert werden. Auf den Proteingehalt bezogen, fand sich der Überwiegende Anteil der Pb^{2+} -Phytochelatin-Komplexe (mehr als 98%) aber außerhalb dieser Vesikel im Cytoplasma. Aus Suspensionskulturen von Dioscorea composita gelang es, reine Präparationen intakter Plastiden, Mitochondrien und Peroxisomen zu isolieren. Phytochelatin-Komplexe sind aus diesen Organellen ausgeschlossen, was die Schutzfunktion des Phytochelatin-Systems belegt.

6. Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an Ratten zeigten, daß in Phytochelatin gebundenes Cadmium geringfügig besser als CdCl_2 resorbiert und fast doppelt so schnell ausgeschieden wird. Phytochelatin ist in einem weiteren Experiment nicht in der Lage gewesen, Cadmium aus Ratten zu dekorporieren.

7. Der Nachweis des Einbaus von Glutathion und γ -Glutamylcystein in Phytochelatin wurde mit zwei unabhängigen Methoden bewiesen. Die Synthese von Phytochelatin trotz Hemmung der Glutamylcysteinsynthetase mit BSO wurde durch anschließende Fütterung von Glutathion bzw. Homoglutathion erreicht. Der Einbau von radioaktiv markiertem Glutathion und γ -Glutamylcystein in Phytochelatin-Peptide konnte nachgewiesen werden. Die Substratpeptide wurden durch enzymatische Synthese, in unterschiedlich und spezifisch markierter Form, selbst hergestellt. Die dazu nötigen Enzyme γ -Glutamylcysteinsynthetase und Glutathionsynthetase wurden aus E. coli C 600 pGS 500 isoliert. Fütterung von Oxothiazolidin-4-Carboxylat und Cystein an Suspensionskulturen von R. serpentina und P. aureus erhöhten die Glutathion- bzw. Homo-Glutathionkonzentration, aber nicht die Phytochelatin-Synthese und Schwermetalltoleranz von R. serpentina, und nur geringfügig die Homo-Phytochelatin-Synthese in P. aureus.

8. Die Enzyme der Homo-Glutathionbiosynthese aus Robinia pseudacacia wurden teilweise gereinigt und die Substratspezifität untersucht. Die γ -Glutamylcysteinsynthetase akzeptiert dieselben Substrate wie entsprechende Enzyme aus anderen Organismen und zeigt in der Gelfiltration ein apparentes Molekulargewicht von 80 kDa. Das für die Synthese des Homoglutathions verantwortliche Enzym ist spezifisch für β -Ala und wurde deshalb als Homoglutathionsynthetase bezeichnet. Die Homoglutathionsynthetase zeigt in der Gelfiltration ein apparentes Molekulargewicht von 115 kDa. Als Dipeptidsubstrat wurde außer γ -Glutamylcystein auch γ -Glutamyl-Aminobutyrat umgesetzt. Das pH-Optimum der Homoglutathionsynthese ist bei pH 8,6.

VI. Literaturverzeichnis

- Anderson M. E. (1985)
Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Biological Samples.
In: Methods in Enzymology 113, 548 - 554; Meister A. Edit., Academic Press, New York
- Anderson M.E., Meister A. (1985)
Preparation of γ -glutamyl Amino Acids by Chemical and Enzymatic Methods.
In: Methods in Enzymology 113, 555 - 564; Meister A. Edit., Academic Press, New York
- Baker A.J.M. (1987)
Metal Tolerance. New Phytol. 106, 93-111
- Bartolf M., Brennan E., Price C.A. (1980)
Partial Characterization of a Cadmium-binding Protein from the Roots of a Cadmium-treated Tomato Plant.
Plant Physiol. 66, 438-441
- Baumeister W. (1967)
Schwermetallpflanzengesellschaften und Zinkresistenz einiger Schwermetallpflanzen. Angew. Botanik 40, 185-204
- Baumeister W., Ernst W. (1978)
Mineralstoffe und Pflanzenwachstum. G. Fischer Verlag, New York
- Bayer E., Kneifel H. (1973)
Strukturermittlung der Vanadiumverbindung des Fliegenpilzes, Amavadin.
Angew. Chem. 85, 542-543
- Beach L.R., Palmiter R.D. (1981)
Amplification of the Metallothionein-I Gene in Cadmium-resistant Mouse Cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2110-2114
- Becker E.W. (1986)
Nutritional Properties of Microalgae: Potentials and Constraints.
In: CRC Handbook of Microalgal Mass Culture, 339 - 376, Richmond A. Edit., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida
- Beltramini M., Lerch K. (1983)
Primary Structure and Spectroscopic Studies of Neurospora Copper-Metallothionein.
Biochemistry 22, 2043 - 2048
- Bensadoun A., Weinstein D. (1976)
Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials. Anal. Biochem. 70, 241-250
- Bergmann L., Rennenberg H. (1975)
Growth Inhibition of Soybean Callus Tissues by Glutathione. Die Naturwissenschaften, 62, 349

- Blakeley S.D., Robaglia C., Brzezinski R., Thirion J.-P. (1986)
Induction of low Molecular Weight Cadmium-binding Compound in Soybean Roots. *J. Exp. Bot.* 37, 956-964
- Bopp M., Brandes H. (1964)
Versuche zur Protonemaentwicklung der Laubmoose. *Planta* 62, 116 - 136
- Bradford M.M. (1976)
A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Proteins utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Bradley R., Burt A.J., Read D.J. (1982)
The Biology of Mycorrhiza in the Ericaceae. VIII. The Role of Mycorrhizal Infection in Heavy Metal Resistance. *New Phytol.* 91, 197-209
- Bradshaw A.D. (1984)
Adaptation of Plants to Soils containing Toxic Metals - a Test for Conceit. In: Origins and Development of Adaptation, CIBA Foundation Symposium 102, 4-19; Evered D., Collins G.M. Edit., Pitman, London
- O'Brady F. (1982)
The Physiological Function of Metalllothionein. *Trends Biochem. Sci.* 7, 143 - 145
- Braun-Blanquet J. (1964)
Pflanzensoziologie
3. Auflage, Springer Verlag, Wien.
- Bremner I., Davies N.T., Mills C.F. (1973)
The Effect of Zinc-Deficiency and Food Restriction on Hepatic Zinc Proteins in the Rat. *Biochem. Soc. Trans.* 1, 982 - 988
- Brooks A., Collins J. C., Thurman D. A. (1980)
The Mechanism of Zinc Tolerance in Grasses. *J. Plant Nutr.* 3, 695 - 705
- Brown M.T., Wilkins D.A. (1985)
Zinc Tolerance of Mycorrhizal Betula. *New Phytol.* 99, 101-106
- Butler J., Spielberg S.P., Schulman J.D. (1976)
Reduction of Disulfide-containing Amines, Amino Acids, and Small Peptides. *Anal. Biochem.* 75, 74-75
- Butt T.R., Sternberg E.J., Gorman J.A., Clark P., Hamer D., Rosenberg M., Crooke S.T. (1984)
Copper Metalllothionein of Yeast, Structure of the Gene, and Regulation of Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3332-3336

- Carnegie P.R. (1963)
Isolation of a Homologue of Glutathione and other Acidic Peptides from Seedlings of Phaseolus aureus.
Biochem. J. 89, 459-471
- Carringer R.D., Rieck C.E., Bush L-P. (1978)
Effect of R-25788 on EPTC Metabolism in Corn (Zea mays).
Weed sci., 26, 167-171
- Casterline J.L., Barnett N.M. (1977)
Isolation and Characterization of a Cadmium-binding Component in Soybean Plants.
Plant Physiol. 59, 124-128
- Casterline J.L., Barnett N.M. (1982)
Cadmium-binding Components in Soybean Plants.
Plant Physiol. 69, 1004-1007
- Cataldo D.A., Wildung R.E. (1978)
Soil and Plant Factors Influencing the Accumulation of Heavy Metals by Plants.
Environ Health Perspect 27, 149-159
- Cataldo D.A., Garland T.R., Wildung R.E. (1978)
Nickel in Plants. II. Distribution and Chemical Form in Soybean Plants.
Plant Physiol. 62, 566-570
- Cataldo D.A., Garland T.R., Wildung R.E. (1981)
Cadmium Distribution and Chemical Fate in Soybean Plants.
Plant Phys. 68, 835-839
- Chang J.-Y. (1983)
Manual Micro-Sequence Analysis of Polypeptides using DimethylazobenzeneIsothiocyanate. In: Methods in Enzymology 91, 455-466; Hirs C.W.H., Timasheff S.N., Edit., Academic Press, New York
- Chen P. S., Toribara T. Y., Warner H. (1956)
Microdetermination of Phosphorus.
Anal. Chem. 28, 1756 - 1758
- Chu S. P. (1942)
The Influence of the Mineral Composition of the Medium on the Growth of Planctonic Algae I: Methods and Culture Media. J. Ecol. 30: 284 - 352
- Conn E.E., Vennesland B. (1951)
Glutathione Reductase of Wheat Germ.
J. Biol. Chem. 192, 17 - 28
- Connell G.E., Adamson E.D. (1970)
†-Glutamyltranspeptidase. In: Methods in Enzymology, 19, 782-789; Perlmann G.E., Lorand L., Edit., Academic Press, New York

- Cousins R.J. (1979)
Zinc Transport Dynamics in Mammalia. Nutr. Rev. 37, 97
- Czihak G., Langer H., Ziegler H. (Hrsg.) (1984)
Biologie - ein Lehrbuch
Springer Verlag Berlin Heidelberg New York
- Dahlgren R. M. T. (1980)
A revised System of Classification of the Angiosperms.
Bot. J. Linnean Soc. (London) 80, 91 - 124
- Day D. A., Neuburger M., Douce R. (1985)
Biochemical Characterization of Chlorophyll-free Mitochondria from Pea Leaves.
Aust. J. Plant Physiol. 12, 219 - 228
- Depta H. Robinson D. G. (1986)
The Isolation and Enrichment of Coated Vesicles from Suspension-cultured Carrot Cells.
Protoplasma 130, 162 - 170
- Durnam D.M., Perrin F., Gannon F., Palmiter R.D. (1980)
Isolation and Characterization of the Mouse Metallothionein-I Gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 6511-615
- Ellman G.L. (1959)
Tissue Sulfhydryl Groups.
Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77
- Enger M.D., Rall L.B., Hildebrand C.E. (1979)
Thionein Gene Expression in Cd⁺⁺-Variants of the CHO Cell: Correlation of Thionein Synthesis Rates with Translatable mRNA during Induction, Deinduction and Superinduction.
Nucl. Acids Res. 7, 271-288
- Ernst W. (1974)
Schwermetallvegetation der Erde. G. Fischer Verlag, Stuttgart
- Fahey R.C., Brown W.C., Adams W.B., Worsham M.B. (1978)
Low Molecular Weight Thiols in Bacteria
J. Bacteriol. 133, 1126
- Fahey R.C., De Stefano D.L., Meier G.P., Bryan R.N. (1980)
Regulation of Protein Synthesis by the Redox State of Glutathione.
Plant Physiol. 65, 1062
- Fialla M.L., Cousins R.J. (1978)
Zinc Accumulation and Metabolism in Primary Cultures of Adult Rat Liver Cell. Regulation by Glucocorticoids.
Biochim. Biophys. Acta 543, 293-304

- Fischer W. R. (1987)
Das Verhalten von Spurenelementen im Boden.
Naturwissenschaften 74, 63 - 70
- Flohe L., Günzler W.A. (1974)
The Biosynthesis of Glutathione in Bovine Erythrocytes.
In: Glutathione, 132 - 139; Flohe L., Benöhr H.Ch., Sies
H., Waller H.D., Wendel A. Edit., Georg Thieme, Stuttgart
- Formanek H. (1979)
Preparation of Hydrophilic, Single Crystal Specimen Sup-
ports of Graphite Oxide
Ultramicroscopy 4, 227 - 232
- Fogel S., Welch J.S. (1982)
Tandem Gene Amplification Mediates Copper Resistance in
Yeast.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5342-5346
- Foyer C.H., Halliwell B. (1976)
Ascorbate Oxidase/Glutathione Reductase Couple confers
Oxidation Protection for Spinach Chloroplasts.
Planta 133, 21
- Frenzel T. (1987)
Enzymatische Untersuchungen zur Biosynthese der Benzyl-
isochinolin- und Protoberberin-Alkaloide
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Friberg L., Piscator M., Nordberg G.F., Kjellström T. (1974)
Cadmium: Occurrence, Possible Routes of Exposure, and
Daily Intake.
In: Cadmium in the Environment 2nd ed., 9-21; Friberg C.,
Piscator M., Nordberg G.F., Kjellström T. Edit., CRC
Press, Inc., Cleveland
- Friedman R.L., Stark G.R. (1985)
 α -Interferon-induced Transcription of HLA and Metallo-
thionein Genes Containing Homologous Upstream Sequences.
Nature 314, 637-639
- Frohne D., Jensen U. (1985)
Systematik des Pflanzenreichs
Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York
- Fujita M. (1985)
The Presence of two Cd-binding Components in the Roots of
Water Hyacinth Cultivated in Cd^{2+} -containing Medium.
Plant Cell Physiol. 26, 295-300
- Fujita M., Kawanishi T. (1986)
Purification and Characterization of a Cd-binding Complex
from the Root Tissue of Water Hyacinth cultivated in a
 Cd^{2+} -containing Medium.
Plant Cell Physiol. 27, 1317-1325

- Furey W.F., Robbins A.H., Clancy L.L., Winge D.R., Wang B.C., Stout C.D. (1986)
Crystal Structure of Cd, Zn-Metalllothionein.
Science 231, 704-710
- Gamborg O.L., Müller P.A., Ojima K. (1968)
Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells.
Exp. Cell. Res. 50, 151-158
- Gekeler W. (1984)
Isoenzymmusteranalyse zur genetischen Charakterisierung und frühen Identifizierung von somatischen Hybriden aus Kartoffel und Tomate
Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Gekeler W., Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M. H. (1988)
Algae sequester Heavy Metals via Synthesis of Phytochelatin Complexes.
Arch. Microbiol., im Druck
- Gingrich D., Weber D. N., Shaw III C. F., Garvey J. S., Petering D. H. (1986)
Characterization of a highly Negative and Labile Binding Protein induced in *Euglena gracilis* by Cadmium.
Environ. Health perspect. 65 77 - 85
- Giovanelli J., Mudd S.H., Datko A.H. (1978)
Homocysteine Synthesis in Green Plants.
J. Biol. Chem. 253, 5665
- Grassmann W., Dyckerhoff H., Eibeler H. (1930)
Über die enzymatische Spaltung des Glutathions. I.
Z. Physiol. Chem. 189, 112 - 124
- Griffith B.B., Walters R.A., Enger M.D., Hildebrand C.E., Griffith J.K. (1983)
cDNA Cloning and Nucleotide Sequence Comparison of Chinese Hamster Metallothionein I and II mRNAs.
Nucleic Acids Res. 11, 901-910
- Griffith O.W. (1981)
Depletion of Glutathione by Inhibition of Biosynthesis.
In: Methods in Enzymology, 77, 59-63; Jacoby W.B., Edit., Academic Press, New York
- Griffith O.W. (1986)
β-Amino Acids: Mammalian Metabolism and Utility as Amino Acid Analogues.
Ann. Rev. Biochem. 55, 855-878
- Griffith O.W., Meister A. (1979)
Potent and Specific Inhibition of Glutathione Synthesis by Buthionine Sulfoximine.
J. Biol. Chem. 254, 7578-7560

- Grill E. (1987)
Phytochelatine - Die Schwermetall-bindenden Peptide der
höheren Pflanze
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H., (1985 a)
Phytochelatin: The Principal Heavy Metal-Complexing
Peptides of Higher Plants.
Science 230, 574-576
- Grill E., Zenk M. H., Winnacker E.-L. (1985b)
Induction of Heavy Metal-sequestering Phytochelatin by
Cadmium in Cell Cultures of Rauvolfia serpentina.
Naturwissenschaften 72, 432-434
- Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H., (1986 a)
Synthesis of Seven Different Homologous Phytochelatins in
Metal-exposed Schizosaccharomyces pombe Cells.
FEBS Letters 197, 115-120
- Grill E., Gekeler W., Winnacker E.-L., Zenk M.H. (1986 b)
Homo-Phytochelatin are Heavy Metal-binding Peptides of
Homo-Glutathione Containing Fabales.
FEBS Letters 205, 47-50
- Grünhage L., Weigel H.-J., Ilge D., Jäger H.-J. (1985)
Isolation and Partial Characterization of a Cadmium-
binding Protein from Pisum sativum.
J. Plant Phys. 119, 327-334
- Gushima H., Miya T., Murata K., Kimura A. (1983 a)
Construction of Glutathione-producing Strains of Escheri-
chia coli B by Recombinant DNA Techniques.
J. Appl. Biochem. 5, 43-52
- Gushima H., Miya T., Murata K., Kimura A. (1983 b)
Purification and Characterization of Glutathione Synthe-
tase from Escherichia coli B.
J. Appl. Biochem. 5, 210-218
- Gutcho M., Lauffer L. (1954)
Paper Chromatography of Glutathione and its Hydrolysis
Products.
In: Glutathione - A Symposium, 79 - 87; Colowick S. P.,
Lazarow A., Racker E., Schwarz D. R., Stadtman E.,
Waelsch H. Edit., Academic Press, New York
- deHaan S. (1975)
Die chemische Zusammensetzung von Gewächsen auf mit Klär-
schlamm behandelten Böden.
Landwirtsch. Forsch. Sonderh. 31, 220 - 231
- Hager J.H., Palmiter R.D. (1981)
Transcriptional Regulation of Mouse Liver Metallothio-
nein-I Gene by Glucocorticoids.
Nature 291, 340-342

- Hallenbeck W.H. (1984)
Human Health Effects of Exposure to Cadmium.
Experientia 40, 136-142
- Hart B. A., Bertram P. E. (1980)
A Cadmium-binding Protein in a Cadmium Tolerant Strain of
Chlorella pyrenoidosa
Envir. Exp. Botany 20: 175 - 180
- Hayashi Y., Nakagawa C.W., Murasugi A. (1986)
Unique Properties of Cd-binding Peptides Induced in
Fission Yeast, Schizosaccharomyces pombe.
Environ. Health Perspect. 65, 13-19
- Heinle H., Sawatzki G., Wendel A. (1976)
Glutathionbiosynthese, VII. Die Biosynthese von Glutathion
in Humanerythrozyten.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 1451-1458
- Higham D.P., Sadler P.J., Scawen M.D. (1983)
Bacterial Cadmium-binding Proteins.
Inorg. Chim. Acta 79, 140-143
- Higham D.P., Sadler P.J., Scawen M.D. (1984)
Cd-resistant Pseudomonas putida Synthesizes Novel Cd
Proteins.
Science 225, 1043-1046
- Higham D.P., Sadler P.J., Scawen M.D. (1986)
Cadmium-binding Proteins in Pseudomonas putida: Pseudo-
thioneins.
Environmental Health Perspectives 65, 5-11
- Hoagland D.R., Snyder W.C. (1933)
Nutrition of Strawberry Plants under Controlled
Conditions. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci. 30, 288-296
- Hopkins F.G. (1929)
Glutathione. J. Biol. Chem. 84, 282-292
- Hübner R., Depta H., Robinson D. G. (1985)
Endocytosis in Maize Root Cap Cells.
Protoplasma 129, 214 - 222
- Hunter J. G., Vergnano O. (1953)
Trace Element Toxicities in Oat Plants.
Ann. Appl. Biol. 40, 761 - 765
- Hunziker P. E., Kägi J. H. R. (1984)
Metallothionein
In: Metalloproteins Part II: Metal-Proteins with Non-
Redox-Roles, 149 - 181; Harison P. Edit., Verlag Chemie,
Weinheim

- Jackson P.J., Roth E.J., McClure P.R., Naranjo C.M. (1984).
Selection, Isolation and Characterization of Cadmium-
Resistant Datura innoxia Suspension Cultures.
Plant Phys. 75, 914-918
- Jackson P., Barton K., Naranjo C., Sillerud L., Trehwella
J., Watt K., Robinson N.J. (1986)
Metal Binding Peptides in Angiosperms.
Abstracts of the first international congress of plant
molecular biology, 35 - 47, Univ. of Georgia Center for
Continuing Education, Athens GA
- Jackson P. J., Unkefer C.J., Doolen J.A., Watt K., Robinson
N. J. (1987)
Poly(γ -Glutamylcysteinyl)Glycine: Its Role in Cadmium
Resistance in Plant Cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6619-6623
- Jaffrè T., Brooks R.R., Lee J., Reeves R.D. (1976)
Sebertia acumminata: A Hyperaccumulator of Nickel from
New Caledonia. Science 193, 579-581
- Joachim S., Robinson D. G. (1984)
Endocytosis of cationic Ferritin by Bean Leaf Proto-
plasts.
Eur. J. Cell Biol. 34, 212 - 216
- Jocelyn S. P. (1972)
Biochemistry of the SH-Group. Academic Press, New York
- Johnston R.B., Bloch K. (1949)
The Synthesis of Glutathione in Cell-free Pigeon Liver
Extracts.
J. Biol. Chem., 179, 493 - 501
- Johnston R.B., Bloch K. (1951)
Enzymatic Synthesis of Glutathione.
J. Biol. Chem. 188, 221 - 234
- Kägi J.H.R., Vallee B.L. (1961)
Metallothionein: a Cadmium and Zinc-containing Protein
from Equine Renal Cortex. II. Physicochemical Properties.
J. Biol. Chem. 236, 2435-2442
- Kägi J.H.R., Nordberg M., (1979)
Metallothionein 1. Birkhäuser Verlag, Basel
- Kägi J.H.R., Kojima Y. (1986)
Metallothionein 2. Birkhäuser Verlag, Basel
- Kaneta M., Hikichi H., Endo S., Sugiyama N. (1983)
Isolation of a Cadmium-binding Protein from Cadmium-
treated Rice Plants.
Agric. Biol. Chem. 47, 417 - 418

- Kaneta M., Hikichi H., Endo S., Sugiyama N. (1986)
Chemical Form of Cadmium (and other Heavy Metals) in Rice
and Wheat Plants.
Environmental Health Perspectives 65, 33-37
- Kannangara C. G., Gough S. P., Hansen B., Rasmussen J. N.,
Simpson D. J. (1977)
A Homogenizer with replaceable Razor Blades for Bulk
Isolation of active Barley Plastids.
Carlsberg Res. Commun. 42, 431 - 439
- Karin M., Herschman H.R. (1981)
Induction of Metallothionein in HeLa Cells by Dexametha-
sone and Zinc.
Eur. J. Biochem. 113, 267-272
- Karin M., Richards R. I. (1982)
Human Metallothionein Genes: Molecular Cloning and
Sequence Analysis of the mRNA.
Nucl. Acids Res. 10, 3165 - 3175
- Karin M., Haslinger A., Holtgreve H., Richards R.I., Krauter
P., Westphal H.M., Beato M. (1984)
Characterization of DNA Sequences through which Cadmium
and Glucocorticoid Hormones induce Human Metallothionein
II A Gene.
Nature 308, 513-519
- Kasai T., Larson P. O. (1980)
Chemical Proof for the Occurrence of Glutathione in Higher
Plants.
In: Progress in the Chemistry of Organic Products, 243 -
244; Herz W., Grisebach H., Kirby G. W. Edit., Springer
Verlag, Wien
- Kasai T., Shiroshita Y., Sakamura S. (1986)
 γ -Glutamyl peptides of Vigna radiata seeds.
Phytochemistry, 25, 679-682
- Kelly P.C., Brooks R.R., Dilli S., Jaffrè T. (1975)
Preliminary Observations on the Ecology and Plant Chemis-
try of some Nickel Accumulating Plants from New
Caledonia.
Proc. Roy. Soc. Lond. B. 189, 69-81
- Kessler E. (1986)
Limits of Growth of five Chlorella Species in the
Presence of Toxic Heavy Metals
Arch. Hydrobiol. Suppl. 73 123 - 128
- Khazaelis M.B., Mitra R.S. (1981)
Cadmium-binding Component in Escherichia coli during
Accommodation to low Levels of this Ion.
Appl. Environ. Microbiol. 41, 46-50

- Kimura M., Otaki N., Imano M. (1979)
Rabbit Liver Metallothionein. Tentative Amino-Acid Sequence of Metallothionein-B.
In: Metallothionein 1, Kägi J.H.R. und Nordberg N., Edit., Birkhäuser Verlag, Basel
- King F. E., Kidd D. A. A. (1949)
A new Synthesis of Glutamine and of γ -Dipeptides of Glutamic Acid from Phthaloylated Intermediates
J. Chem. Soc. 1949, 3315 - 3319
- Kissling M.M., Kägi J.H.R. (1977)
Primary Structure of Human Hepatic Metallothioneins.
FEBS Lett. 82, 247-250
- Kjellström T., Linnman L. B., Ellinder C. G. (1975)
Variation of Cadmium Concentration in Swedish Wheat and Barley.
Arch. Environ. health 30, 321-332
- Kojima Y., Berger C., Vallee B.L., Kägi J.H.R. (1976)
Amino-Acid Sequence of Equine Renal Metallothionein-1B.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 3413-3417
- Kondo N., Isobe M., Imai K., Goto T. (1983)
Structure of Cadystin, the Unit Peptide of Cadmium-binding Peptides Induced in a Fission Yeast, Schizosaccharomyces pombe. Tetrahedron Lett. 24, 925-928
- Kondo N., Isobe M., Imai K., Goto T. (1984)
Cadystin A and B, Major Unit Peptides Comprising Cadmium Binding Peptides Induced in a Fission Yeast.
Tetrahedron Lett. 25, 3869-3872
- Kondo N., Isobe M., Imai K., Goto T. (1985)
Synthesis of Metallothionein-like Peptides Cadystin A and B Occurring in a Fission Yeast, and their Isomers.
Agric. Biol. Chem. 49, 71-83
- Kosower E.M. (1976)
Glutathione, an Ubiquitous and Central Metabolite.
In Glutathione: Metabolism and Function, 1; Arias J.M., Jacoby W.B., Edit., Raven Press, New York
- Krauss F., Schmidt A. (1987)
Sulphur Sources for Growth of Chlorella fusca and their Influence on Key Enzymes of Sulphur Metabolism.
J. of Gen. Microbiol. 133, 1209-1219
- Kruse H., Lommel A. (1979)
Untersuchungen über cadmiumbindende Proteine im Schaf-Champignon. Lebensm. Unters. Forsch. 168, 444-447
- Kuwata K., Uebori M., Yamada K., Yamazaki Y. (1986)
Liquid Chromatographic Determination of Alkylthiols via Derivatization with 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoic acid)
Anal. Chem. 54, 1082 - 1087

- Lamoureux G.L., Rusness D.G. (1981)
Herbicide Detoxification in Higher Plants.
In: Sulfur in Pesticide Action and Metabolism, ACS
Symposium Series, 158, 132; Rosen J.D., Magee P.S.,
Casida J.E., Edit., American Chemical Society
- Lastowski-Perry D., Otto E., Maroni G. (1985)
Nucleotide Sequence and Expression of a Drosophila Me-
tallothionein. J. Biol. Chem. 260, 1527-1530
- Law M.Y., Halliwell B. (1986)
Purification and Properties of Glutathione Synthetase
from Spinach (Spinacia oleracea) Leaves.
Plant Science, 43, 185-191
- Lerch K. (1980)
Copper Metallothionein, a Copper-binding Protein from
Neurospora crassa.
Nature 284, 368-370
- Lerch K. (1981)
Fungal Copper Metallothioneins: A New Class of Metallo-
thioneins.
Met. Ions Biol. Syst. 13, 299-316
- Lerch K. (1984)
Sequence of the Gene for a Copper-Thionein from Neurospo-
ra crassa
Nucleic Acids Res. 10, 112 - 115
- Lerch K., Beltramini M. (1986)
Sequence Determination of a Copper - Metallothionein from
Agaricus bisporus.
J. Gen. Microbiol. 132, 214 - 221
- Linsmaier E.M., Skoog (1965)
Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue
Cultures.
Physiol. Plant. 18, 100-127
- Lolkema P.C., Donker M.H., Schouten A.J., Ernst W.O.H.
(1984)
The Possible Role of Metallothioneins in Copper Tolerance
of Silene cucubalus.
Planta 162, 174-179
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951).
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-273
- Lue-Kim H., Rauser W.E. (1986)
Partial Characterization of a Cadmium-binding Protein
from Roots of Tomato. Plant. Phys. 81, 896-900

- Macnair M.R. (1981)
Tolerance of Higher Plants to Toxic Materials.
In: Genetic Consequences of Man Made Change, 177-207;
Bishop J.A., Cooke L.M, Edit., Academic Press, London &
New York
- Macnair M. R. (1983)
The Genetic Control of Copper Tolerance in the Yellow
Monkey Flower, *Mimulus guttatus*.
Heredity 50, 283 - 293
- Macnicol P. K. (1987)
Homoglutathione and Glutathione Synthetases of Legume
Seedlings: Partial Purification and Substrate Specificity.
Plant Science 53, 229 - 235
- Macnicol P.K., Bergmann L. (1984)
A Role for Homoglutathione in Organic Sulphur Transport
to the Developing Mung Bean Seed.
Plant Sci. Lett., 36, 219-223
- Margoshes M., Vallee B.L. (1957)
A Cadmium-binding Protein from Equine Kidney Cortex.
J. Am. Chem. Soc. 79, 4813-4814
- Mathys W. (1977)
The Role of Malate, Oxalate and Mustard oil Glucosides in
the Evolution of Zinc-Resistance in Herbage Plants.
Physiol. Plant. 40, 130-136
- Meister A. (1985)
Glutamate, Glutamine, Glutathione and related Compounds.
Methods in Enzymology, 113, Acad. Press, New York
- Meister A., Tate S.S. (1976)
Glutathione and other Related γ -glutamyl Compounds.
Ann. Rev. Biochem. 45, 559-604
- Meister A., Tate S. S., Griffith W. O. (1981)
Synthesis of N-Phthaloyl-Glutamic Anhydride
In: Methods in Enzymology 77, 237 - 238; Jacoby W. B.
Edit., Academic press, New York
- Melchior H. (Hrsg.) (1964)
A. Englers Syllabus der Pflanzenfamilien. II. Band:
Angiospermen.
12. Auflage, Gebr. Borntraeger, Berlin
- Metzler D. E. (1977)
Biochemistry. Academic Press New York
- Mooz E.D., Meister A. (1979)
Glutathione Biosynthesis. I. γ -Glutamylcysteine Synthe-
tase (Hog liver), II. Glutathione (Tripeptide) Synthetase
(Yeast).
In: Methods in Enzymology, 17B, 483-499; Tabor H., Tabor
C.W., Edit., Academic Press, New York

- Moser W. F. (1958)
Isolierung und Kultur von Hefepilzen.
Z. Naturforsch. 8 c, 17 - 81
- Müller H. (1972)
Wachstum und Phosphatbedarf von Nitzschia actinastroides (Lemm) var. Goor in statischer und homokontinuierlicher Kultur unter Phosphatlimitierung.
Arch. Hydrobiol. Suppl. 38: 399 - 484
- Münger K., Lerch K. (1985)
Copper Metallothionein from the Fungus Agaricus bisporus: Chemical and Spectroscopic Properties.
Biochem. 24, 6751-6756
- Murashige T., Skoog F. (1962)
A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Cultures.
Physiol. Plant. 16, 473 - 479
- Murasugi A., Wada C., Hayashi Y. (1981)
Cadmium-binding Peptide Induced in Fission Yeast.
J. Biochem. 90, 1561-1564
- Murasugi A., Wada C., Hayashi Y. (1983)
Occurrence of Acid-Labile Sulfide in Cadmium-binding peptide 1 from Fission Yeast.
J. Biochem. 93, 661 - 664
- Murata K., Kimura A. (1982)
Selection of Glutathione-deficient E. coli-Strains with Tetramethyl-Thiuram-Disulfide.
Appl. Environ. Microbiol., 44, 1444-1448
- Nagano T., Watanabe Y., Hida K., Suketa Y., Okada S. (1982)
Production of Cadmium-binding Protein in Chlorella ellipsoidea.
Eisei Kagaku 28: 83 - 88
- Nagano T., Miwa M., Suketa Y., Okada S. (1984)
Isolation, Physicochemical Properties, and Amino Acid Composition of a Cadmium-binding Protein from Cadmium-treated Chlorella ellipsoidea.
J. Inorg. Biochem. 21, 61-71
- Newton G.L., Dorian R., Fahey R. C. (1981)
Analysis of Biological Thiols: Derivatization with Monobromobimane and Separation by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography.
Anal. Biochem. 114: 383 - 387
- Newton G., Javor B. (1985)
γ-Glutamylcysteine and Thiosulfate are the Major Low-Molecular-Weight Thiols in Halobacteria.
J. of Bacteriology, 161, 438-441

- Nicholson C., Stein J., Wilson K.A. (1980)
Identification of the Low Molecular Weight Copper Protein
from Copper-intoxicated Mung Bean Plants.
Plant Phys. 66, 272-275
- Nordberg G.F. (1972)
Cadmium Metabolism and Toxicity.
Environ. Physiol. Biochem. 2, 7-36
- Nordberg G. F., Goyer R. A., Nordberg M. (1975)
Uptake of Metallothionein by Renal Cortex Tissue.
Archs. Path. 99, 192 - 197
- Olafson R.W. (1984)
Prokaryotic Metallothionein: Amino Terminal Sequence
Analysis of a Unique Metallothionein.
Int. J. Peptide Protein Res. 24, 303-308
- Olafson R.W. (1986)
Physiological and Chemical Characterization of Cyano-
bacterial Metallothioneins.
Environ. Health Perspect. 65, 71-75
- Olafson R.W., Abel K., Sim R. G. (1979)
Prokaryotic Metallothionein: Preliminary Characteristics
of a Blue-Green Algal Heavy Metal-binding Protein.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 36-40
- Olafson R.W., Soya S., Sim R.G. (1980)
Physiological Parameters of Prokaryotic Metallothionein
Induction.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 1495-1503
- Orlowski M., Meister A. (1971)
Isolation of Highly Purified γ -Glutamylcysteine Synthe-
tase from Rat Kidney.
Biochemistry, 10, 372-380
- Otvos J.D., Armitage I.M. (1980)
Structure of the Metal Clusters in Rabbit Liver Metallo-
thionein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7094-7098
- Owens C. W. I., Belcher R. V. (1965)
A Colorimetric Micro-Method for the Determination of
Glutathione.
Biochem. J. 94, 705 - 711
- Petrunkina N. S. (1974)
Geochemical Ecology of Plants in Provinces with an excess
Trace Element Content.
Akd. Nauk. Trudy Biogeochemicheskoi Laboratorii 13, 57-73
- Pesacreta T. C., Lucas W. J. (1984)
Presence of a Partially-coated Reticulum and a Plasma
Membrane Coat in Angiosperms.
Protoplasma 125, 173 - 184

- Pirie N.W. (1930)
Preparation of Glutathione. *Biochem. J.* 24, 51-54
- Piscator M. (1964)
Metallothionein-bound Cadmium is transported from Liver to Kidneys.
Nord. Hyg. Tidskr. 45, 76 - 81
- Premakumar R., Winge D.R., Wiley R.D., Rajagopalan K.V. (1975)
Copper-Chelatin: Isolation from Various Eucaryotic Sources. *Arch. Biochem. Biophys.* 170, 278-283
- Price C.A. (1957)
A new Thiol in Legumes. *Nature* 180, 148-149
- Poulter A., Collin H. A., Hardwick K., Thurmann D. A. (1985)
The Role of the Cell Wall in the Mechanism of Lead and Zinc Tolerance in *Anthoxanthum odoratum*.
Plant Sci. Lett. 42, 61 - 66
- Qreshi J. A., Hardwick K., Collin H. A. (1986)
Intracellular Localization of Lead in a Lead Tolerant and Sensitive Clone of *Anthoxanthum odoratum*.
J. Plant Physiol. 122, 357 - 364
- Rauser W.E. (1984)
Copper-binding Protein and Copper Tolerance in *Agrostis gigantea*.
Plant Sci. Lett. 33, 239-247
- Rauser W.E., Curvetto N.R. (1980)
Metallothionein Occurs in Roots of *Agrostis* Tolerant to Excess Copper.
Nature 287, 563-564
- Rauser W.E., Hartmann H.-J., Weser U. (1983)
Cadmium-thiolate Protein from the Grass *Agrostis gigantea*. *FEBS Letters* 164, 102-104
- Reeve J., Kuhlenskamp J. (1980)
Estimation of Glutathione in Rat Liver by Reversed-Phase High-performance Liquid Chromatography: Separation from Cysteine and Glutamylcysteine.
J. Chromatogr. 194, 424 - 428
- Reese R.N., Wagner G.J. (1987 a)
Properties of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Cadmium-binding Peptide(s). *Biochem. J.* 241, 641-647
- Reese R.N., Wagner G.J. (1987 b)
Effects of Buthionine Sulfoximine on Cd-binding Peptide Levels in Suspension-cultured Tobacco Cells Treated with Cd, Zn or Cu.
Plant Physiol. 84, 574-577

- Rennenberg H. (1982)
Glutathione Metabolism and Possible Biological Roles in
Higher Plants.
Phytochemistry 21, 2771-2781
- Rennenberg H., Uthemann R. (1980)
Effects of L-Methionine-S-Sulfoximine on Growth and
Glutathione Synthesis in Tobacco Suspension Cultures.
Z. Naturforsch. 35 c, 945-951
- Riddles P.W., Blakeley R.L., Zerner B. (1983)
Reassessment of Ellman's reagent. In: Methods in Enzymo-
logy 91, 49-59. Hirs C.H.W., Timasheff S.N. Edit.,
Academic Press, New York
- Robinson N.J., Thurman D.A. (1986)
Involvement of a Metallothionein-like Copper Complex in
the Mechanism of Copper Tolerance in Mimulus guttatus.
Proc. R. Soc. Lond. 227, 493-501
- Robinson N.J., Barton K., Naranjo C.W., Sillerud L.O.,
Trehwella J., Watt K., Jackson P.J. (1986)
Characterization of Metal-binding Peptides from Cadmium-
Resistant Plant Cells.
In: Metallothionein 2, Kägi J.H.R. und Kojima Y., Edit.,
Birkhäuser Verlag, Basel
- Russel P., Nurse P. (1986)
Schizosaccharomyces pombe and Saccharomyces cerevisiae: a
Look at Yeasts Divided. Cell 45, 781-782
- Sanger F. (1949)
The terminal Peptides of Insulin.
Biochem. J. 45, 563 - 574
- Scheller H.V., Huang B., Hatch E., Goldsbrough P.B. (1987)
Phytochelatin Synthesis and Glutathione Levels in
Response to Heavy Metals in Tomato Cells.
Plant Physiol. 85, 1031-1035
- Schindler C., Soll J. (1986)
Protein Transport in Intact, Purified Pea Etioplasts.
Arch. Biochem. Biophys. 247, 211 - 220
- Schlee D. (1986)
Ökologische Biochemie.
Springer Verlag Berlin Heidelberg New York
- Schlösser U. G. (1982)
Sammlung von Algenkulturen
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 95, 181 - 276
- Schmidt C.J., Hamer D. (1983)
Cloning and Sequence Analysis of two Monkey Metallothio-
nein cDNAs. Gene 24, 137-146

- Schmitt J.A., Meisch H.U. (1985)
Cadmium in Mushrooms - Distribution, Growth Effects and Binding.
Trace Elements in Medicine 2, 163-166
- Schwitzguebel J.-P., Siegenthaler P.-A. (1984)
Purification of Peroxisomes and Mitochondria from Spinach Leaf by Percoll Gradient Centrifugation.
Plant Physiol. 75, 670 - 674
- Seelig G.F., Meister A. (1985)
Glutathione Biosynthesis: γ -Glutamylcysteine Synthetase from Rat Kidney.
In: Methods in Enzymology 113, Meister A. Edit.; 379-407
- Severne B.C., Brooks R.R. (1972)
A Nickel-accumulating Plant from Western Australia.
Planta 103, 91-94
- Silbernagl S., Pfaller W., Heinle H., Wendel A. (1978)
Topology and Function of Renal γ -Glutamyl Transpeptidase.
In: Functions of Glutathione in Liver and Kidney, 60-69;
Sies H., Wendel A. Edit., Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- Sliwowski M. X., Levine R. L. (1985)
Labeling of Cysteine-Containing Peptides with 2-Nitro-5-thiobenzoic Acid
Anal. Biochem. 147, 369 - 373
- Snoke J. E. (1955)
Isolation and Properties of Yeast Glutathione Synthetase.
J. Biol. Chem. 199, 813 - 822
- Snoke J.E., Bloch K. (1952)
Formation and Utilisation of γ -Glutamylcysteine in Glutathione Synthesis.
J. Biol. Chem., 199, 407
- Snoke J.E., Yanari S., Bloch K. (1953)
Synthesis of Glutathione from γ -Glutamylcysteine.
J. Biol. Chem., 201, 573
- Soll J., Wanner G., Henkelmann G., Röper U., Schulze M. (1986)
Isolation of a Fraction Enriched in Envelope Membranes from purified Pea (*Pisum sativum*) Etioplasts.
In: Regulation of Chloroplast Differentiation, 229 - 234;
Alan R. Liss Inc.
- Spurr, A. (1969)
A Low-viscosity Epoxy Resin Embedding Medium for Electron Microscopy.
J. Ultrastructure Research 26, 31 - 43

- Squibb K.S., Cousins R.J. (1977)
Synthesis of Metallothionein in a Polysomal Cell-free System.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 24-30
- Steffens J.C., Hunt D.F., Williams B.G. (1986)
Accumulation of Non-Protein Metal-binding Polypeptides (γ -Glutamyl-Cysteinyl)n-Glycine in Selected Cadmium Resistant Tomato Cells.
J. Biol. Chem. 261, 13879-13882
- Steffens J.C., Williams B. (1987)
Increased Activity of γ -Glutamylcysteine Synthetase in Cd-Resistant Tomato Cells. Abstracts of a Meeting of the Amer. Soc. Plant Physiol., West Lafayette IN, USA
- Steinman R. M., Mellman I. S., Mueller W. A., Cohn Z. A. (1983)
Endocytosis and the Recycling of Plasma Membrane.
J. Cell Biol. 96, 1 - 27
- Stokes P. M., Maler T., Riordan J. R. (1977)
A low Molecular Weight Copper-binding Protein in a Copper Tolerant Strain of Scenedesmus acutiformis.
In: Trace Substances in Environmental Health - XI. , 146 - 154; Hemphill D. D., Edit. Univ. of Missouri Press, Columbia MO
- Suzuki F., Nakamura Y., Kimura Y., Muramatsu H., Nagata Y. (1986)
Enzyme Immunoassay for Tetrahymena-Metallothionein by a heterogeneous Sandwich Method.
Agric. Biol. Chem. 51, 923 - 925
- Tanchak M. A., Griffing L. R., Mersey B. G., Fowke L. C. (1984)
Endocytosis of Cationized Ferritin by Coated Vesicles of Soybean Protoplasts.
Planta 162, 481 - 486
- Tietze F. (1969)
Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues.
Analytical Biochemistry 27, 502-522
- Tsuchiya K. (1978)
Cadmium Studies in Japan - A Review, 1 - 376; Elsevier North Holland
- Tukendorf A., Lyszcz S., Baszynski L. (1984)
Copper Binding Proteins in Spinach Tolerant to Excess Copper.
J. Plant Physiol. 115, 351-360

- Turner R.G., Marshall C. (1972)
The Accumulation of Zn by Subcellular Fractions of Roots
of Agrostis tenuis Sibth.
New Phytol. 71, 671-676
- Tynecka Z., Gos Z., Zajac J. (1981)
Reduced Cadmium Transport Determined by a Resistance
Plasmid in Staphylococcus aureus.
J. Bacteriol. 147, 305-312
- Ulbrich B., Zenk M.H. (1979)
Partial Purification of Hydroxycinnamoyl-CoA: Quinate
Hydroxycinnamoyl Transferase from Higher Plants.
Phytochem. 18, 929-933
- Umweltbundesamt 1980
Was sie schon immer über Umweltchemikalien wissen
wollten. Bundesministerium des Inneren, Edit., Verlag
Kohlhammer, Stuttgart
- Vasak M., Kägi J. H. R. (1983)
Heavy-Metal Binding Constants of Metallothionein.
In: Metal Ions in Biological Systems, 213 - 273; Sigel H.
Edit., Marcel Dekker, New York
- Wagner G.J. (1984)
Characterization of a Cadmium-binding Complex of Cabbage
Leaves. Plant Physiol. 76, 797-805
- Wagner G.J., Trotter M.M. (1982)
Inducible Cadmium-binding Complexes of Cabbage and
Tobacco. Plant Physiol. 69, 804-809
- Walker D. A. (1964)
Improved Rates of Carbon Dioxide Fixation by Illuminated
Chloroplasts.
Biochem. J. 92, 22 c
- Watanabe K., Murata K., Kimura A. (1986)
Purification and Characterization of γ -Glutamylcysteine
Synthetase of Escherichia coli B.
Agric. Biol. Chem., 50, 1925-1930
- Webb M., Cain K. (1982)
Functions of Metallothionein.
Biochem. Pharmacol. 31, 137-142
- Weber D.N., Shaw C.F., Petering D.H. (1987)
Euglena gracilis Cd-binding Protein-II contains Sulfide
Ion.
J. Biol. Chem. 262, 6962-6964
- Webster G.C. (1953)
Peptide-bond Synthesis in Higher Plants. I. The Synthesis
of Glutathione. Arch. Biochem. Biophys., 47, 241-250

- Webster G.C., Varner J.E. (1954 a)
Peptide-bond Synthesis in Higher Plants. II. Studies on
the Mechanism of Synthesis of γ -Glutamylcysteine.
Arch. Biochem. Biophys., 52, 22-32
- Webster G.C., Varner J.E. (1954 b)
Peptide-bond Synthesis in Higher Plants. III. The
Formation of Glutathione from Glutamylcysteine.
Arch. Biochem. Biophys. 55, 95 - 103
- Weetall H. H. (1976)
Covalent Coupling Methods for Inorganic Support
Materials.
In: Methods in Enzymology 44, 134 - 137; Mosbach K.
Edit., Academic Press, New York
- Weigel H.J., Jäger H.J. (1980)
Subcellular Distribution and Chemical Form of Cadmium in
Bean Plants.
Plant Phys. 65, 480-482
- Wendel A., Gumboldt G., Hahn R. (1975)
Determination of Activity and Normal Values of Glutamate:
Cysteine-ligase in Human Erythrocytes.
Klin. Chem. Klin. Biochem., 13, 157-161
- White P. R. (1933)
Potentially Unlimited Growth of Excised Plant Callus in
an Artificial Nutrient.
Am. J. Bot. 26, 59 - 64
- Williams R. J. P. (1984)
Zinc - What is its Role in Biology.
Endeavour 8, 65 - 70
- Williamson J.M., Meister a. (1981)
Stimulation of Hepatic Glutathione Formation by
Administration of L-2-Oxothiazolidine-4-Carboxylate, a 5-
Oxo-L-Proline Substrate.
Proc. Natl. Acad. Sci USA, 78, 936-939
- Winge D. R., Miklossy K. A. (1982)
Domain Nature of Metallothionein.
J. Biol. Chem. 257, 3471 - 3479
- Yamaguchi N., Wada O., Ono T., Nagahashi M. (1978)
A Metallothionein-like Protein in Tetrahymena pyriformis.
Industrial Health 16, 15 - 18
- Yanari S., Snoke J.E., Bloch K. (1953)
Energy Sources in Glutathione Biosynthesis.
J. Biol. Chem. 201, 561
- Yoshida S. (1986)
Isolation and Partial Purification of a Cadmium-binding
Protein in Soybeans from a Cadmium-polluted Field.
Agric. Biol. Chem. 50, 2273 - 2278

Danksagung

Herrn Professor Dr. M. H. Zenk danke ich herzlich, daß er mich zur Anfertigung dieser Dissertation in seinen Arbeitskreis aufgenommen hat und das Thema überließ. Seine intensive Betreuung und ständiges Interesse am Fortgang der Experimente haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Wissenschaftliche Schulung und menschliche Erfahrungen durch ihn haben mich tief beeindruckt. Seine Reputation führte dazu, daß mehrere andere Arbeitskreise meine Arbeit unterstützten.

Allen Mitarbeitern am Lehrstuhl von Prof. Dr. M. H. Zenk bin ich für die mit Rat und Tat bereitwillig gewährte Hilfe sehr dankbar. Die Freundlichkeit und Geduld, die mir entgegengebracht wurden, auch wenn ich selbst ungeduldig und nervös war, sind nicht hoch genug einzuschätzen.

Den Mitarbeitern des Botanischen Gartens München, sowie Herrn Dr. G. Rossmann vom Ökologisch-Botanischen Garten Bayreuth danke ich herzlich für die Fülle von Samenproben und Pflanzenmaterial, die ich aus den Sammlungen erhalten konnte.

Herr Prof. Dr. F. Oberwinkler stellte eine umfangreiche Kollektion von Pilzstämmen zur Verfügung, ebenso Prof. Dr. A. Bresinsky. Dafür sei auch im Namen der weiteren Nutzer der Sammlung herzlich gedankt.

Herr Prof. Dr. A. Schmidt versorgte mich mit fast unerschöpflichem Nachschub von Chlorella- und Synechococcus-Kulturen. Ihm sei für diese arbeitsaufwendige Unterstützung besonderer Dank ausgesprochen.

Dr. N. Walz überließ mir etliche Algenstämme aus seiner Sammlung, dafür bedanke ich mich herzlich. Herr Prof. Dr. P. Böger und Prof. Dr. D. G. Müller überließen mir freundlicherweise einige Algenkulturen, als Stämme oder Massenkulturen. Ihnen sei für die bereitwillige Unterstützung und wertvolle Hinweise zur Algentaxonomie gedankt.

Herr Dr. G. Wanner hat die elektronenmikroskopischen Untersuchungen angeleitet und durchgeführt. Für die selbstlose Unterstützung und wertvolle Diskussionen bedanke ich mich herzlich.

Herrn Dr. J. Soll danke ich herzlich für die freundliche Aufnahme in seinem Arbeitskreis zur Isolierung von Zellorganellen. Sein Fachwissen und seine Hilfsbereitschaft trugen wesentlich zum Gelingen dieser Experimente bei.

Zur Durchführung der Experimente mit ^{109}Cd war ich auf die Hilfe der Abt. Nuklearbiologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung angewiesen. Ich wurde dort sehr freundlich aufgenommen und großzügig unterstützt. Frau Reitmaier, Herrn Dr. Berg und Herrn Dr. Kollmer gilt mein herzlicher Dank für ihre tatkräftige Hilfe.

Diese Arbeit wurde mit Sachmitteln im Rahmen der Laboratorien für Molekulare Biologie - Genzentrum - der Universität München unterstützt. Empfänger der Gelder war Prof. Dr. M. H. Zenk.

Lebenslauf

Am 17.5.1956 wurde ich, Walter Hermann Friedrich Gekeler, als Sohn des Textilingenieurs Ulrich Gekeler und seiner Frau, der Studienrätin Eva, geb. Glück, in Heidenheim/Brenz geboren. Seit Juli 1983 bin ich mit Uta-Susanne, geb. Lang, verheiratet, am 9. Januar 1987 wurde unsere Tochter Anna Katharina geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule in Wächtersbach/Hessen in den Jahren 1963 bis 1966 trat ich in das Grimmelshausen-Gymnasium in Gelnhausen ein. Im Juni 1975 schloß ich die Schulausbildung im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig mit dem Abitur ab.

Dem Wehrdienst in den Jahren 1975 und 1976 schloß sich direkt, im Wintersemester 1976, die Aufnahme des Studiums im Fachbereich Biochemie an der Universität Tübingen an. Nach dem ersten Teil (Oktober 1977) und zweiten Teil des Vordiploms (April 1979) war ich im Wintersemester 1979 und Wintersemester 1981 neben dem Studium als studentische Hilfskraft am MPI für Virusforschung in Tübingen beschäftigt. Von April 1980 bis April 1981 war ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München eingeschrieben, um ein ganzjähriges Praktikum am MPI für Biochemie, Martinsried, zu absolvieren. Danach wechselte ich nach Tübingen zurück, wo sich der Diplomprüfung im April 1982 die Diplomarbeit zum Thema "Isoenzymmusteranalyse zur frühen Identifizierung von somatischen Hybriden aus Kartoffel und Tomate" bis Juni 1984 anschloß.

Im Februar 1985 begann ich unter Anleitung von Prof. Dr. M. H. Zenk am Institut für Pharmazeutische Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Von Februar 1985 bis Februar 1988 war ich am selben Institut als wissenschaftliche Hilfskraft teilzeitbeschäftigt.

